

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

ÁREA DE ZOOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**Bases para implementar la lucha biológica contra *Ceratitis capitata*
(Diptera: Tephritidae) mediante el empleo de *Aganaspis daci*
(Hymenoptera: Figitidae)**

Tesis Doctoral presentada por el Licenciado **D. Luis de Pedro Noriega** para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2017.

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, PARASITOLOGÍA,
ECOLOGÍA, EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

ÁREA DE ZOOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**Bases para implementar la lucha biológica contra *Ceratitis capitata*
(Diptera: Tephritidae) mediante el empleo de *Aganaspis daci*
(Hymenoptera: Figitidae)**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Luis de Pedro Noriega'.

Fdo.: D. Luis de Pedro Noriega

Salamanca, 2017.



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA,
EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA**

ÁREA DE ZOOLOGÍA

Los Doctores **D. José Tormos Ferrando**, Catedrático de Zoología de la Universidad de Salamanca; **D. Josep Daniel Asís Pardo**, Catedrático de Zoología de la Universidad de Salamanca; **D. Francisco José Beitia Crespo**, Investigador del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA); y **Dña. Beatriz Sabater Muñoz**, Colaborador Científico Adjunto del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA,

AUTORIZAN:

La presentación, para su lectura, de la Tesis Doctoral titulada "**Bases para implementar la lucha biológica contra *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) mediante el empleo de *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae)**", realizada por **D. Luis de Pedro Noriega**, bajo su dirección, en la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos legales, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 23 de Junio de 2017.

Fdo.: José Tormos Ferrando

Fdo.: Josep Daniel Asís Pardo

Fdo.: Francisco José Beitia Crespo

Fdo.: Beatriz Sabater Muñoz



La presente Tesis Doctoral está elaborada en el formato de compendio de artículos/publicaciones según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado y Posgrado de la Universidad de Salamanca el 15 de febrero de 2013 y consta de las siguientes publicaciones:

Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in *Aganaspis parasitoids* (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies

José Tormos¹, Luis de Pedro¹, Francisco Beitia², Beatriz Sabater-Muñoz², Josep Daniel Asís¹, Carlo Polidori³

¹Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España; ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial 46113-Montcada, Valencia, España; ³Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C\ José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, España.

Microscopy and Microanalysis 19,1475-1489, 2013.

Factor de impacto (2013): 1,757. doi:10.1017/S1431927613013330

Effect of temperature on the developmental time, survival of immatures and adult longevity of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a natural enemy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Luis de Pedro^{1,2}, Francisco Beitia², Beatriz Sabater-Muñoz³, Josep Daniel Asís¹, José Tormos¹

¹Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España; ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial 46113-Montcada, Valencia, España; ³Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublín, Irlanda.

Crop Protection 85 (2016) 17–22.

Factor de impacto (2016): 1,834. doi:10.1016/j.cropro.2016.03.010

Parasitism of *Aganaspis daci* against *Ceratitis capitata* under Mediterranean climate conditions

Luis de Pedro^{1,2}, Francisco Beitia², Beatriz Sabater-Muñoz^{2,3}, Ahlem Harbi^{2,4}, Fernando Ferrara^{2,5}, Carlo Polidori⁶, Josep Daniel Asís¹, José Tormos¹

¹Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España; ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial 46113-Montcada, Valencia, España; ³Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublín, Irlanda; ⁴Institut Supérieure Agronomique de Chott-Mériem, Université de Sousse, 4042, Chott-Mériem, Túnez; ⁵Instituto Federal Fluminense (IFF), Campus Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, Brasil; ⁶Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos II, s/n, E-45071, Toledo, España.

Entomologia Experimentalis et Applicata **163**: 287–295, 2017.

Factor de impacto (2016): 1,162. doi:10.1111/eea.12585

Effect of host density and location on the percentage parasitism, fertility and induced mortality of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Luis de Pedro^{1,2}, Francisco Beitia², Fernando Ferrara^{2,3}, Josep Daniel Asís¹, Beatriz Sabater-Muñoz^{2,4}, José Tormos¹

¹Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España; ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial 46113-Montcada, Valencia, España; ³Instituto Federal Fluminense (IFF), Campus Bom Jesus do Itabapoana, Río de Janeiro, Brasil; ⁴Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublín, Irlanda.

Crop Protection 92 (2017) 160–167.

Factor de impacto (2016): 1,834. doi:10.1016/j.cropro.2016.11.007

Adicionalmente, se añade la versión resumida de dos artículos (correspondientes a los capítulos 1 y 4 de la Tesis) que han sido enviados para su publicación en revistas de impacto:

First field record and surveillance of *Aganaspis daci* on citrus fields affected by *Ceratitis capitata* in Spain

Luis de Pedro^{1,2}, Francisco Beitia¹, José Vicente Falcó³, Nikos T. Papadopoulos⁴, Josep Daniel Asís², José Tormos², Beatriz Sabater-Muñoz^{1,5}

¹Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial 46113-Montcada, Valencia, España; ²Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España; ³Laboratorio de Entomología y Control de Plagas, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva (ICBIBE), Universitat de València, 46980, Paterna, Valencia, España; ⁴Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology, Department of Agriculture, Crop Production and Rural Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Phytokou St., 38446, Nea Ionia, Magnisias, Grecia; ⁵Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublín, Irlanda.

Biology of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): mode of reproduction, biological parameters and superparasitism

Luis de Pedro^{1,2}, Francisco Beitia², Beatriz Sabater-Muñoz^{2,3}, Josep Daniel Asís¹, José Tormos¹

¹Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España; ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial 46113-Montcada, Valencia, España; ³Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublín, Irlanda.



VNIVERSIDAD
SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
ANIMAL, PARASITOLOGÍA, ECOLOGÍA,
EDAFOLOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA

ÁREA DE ZOOLOGÍA

Los Doctores **D. José Tormos Ferrando**, Catedrático de Zoología de la Universidad de Salamanca; **D. Josep Daniel Asís Pardo**, Catedrático de Zoología de la Universidad de Salamanca; **D. Francisco José Beitia Crespo**, Investigador del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA); y **Dña. Beatriz Sabater Muñoz**, Colaborador Científico Adjunto del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del IVIA,

AUTORIZAN:

Que la Tesis Doctoral titulada "**Bases para implementar la lucha biológica contra *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) mediante el empleo de *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae)**" sea presentada en la modalidad de compendio de artículos/publicaciones (Comisión de Doctorado y Posgrado, 15 de febrero de 2013).

Y para que así conste a los efectos legales, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 23 de Junio de 2017.

Fdo.: José Tormos Ferrando

Fdo.: Josep Daniel Asís Pardo

Fdo.: Francisco José Beitia Crespo

Fdo.: Beatriz Sabater Muñoz

D. Luis de Pedro Noriega ha sido beneficiario de una **Beca de postgrado del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU)** del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (referencia: AP2010-2340) durante 4 años (diciembre 2011- diciembre 2015).

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por el proyecto "Nuevas herramientas para el control de la mosca mediterránea de la fruta" AGL2010-21349-C02-02 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y por encima de todo, quiero agradecer a mis padres y a mi hermana el apoyo que me han prestado durante la elaboración de esta tesis. Sus ánimos, su cariño, su ayuda económica y, por qué no decirlo, su paciencia en mis momentos de agobio y mal humor (que no han sido pocos durante estos años) han sido fundamentales para que todo este trabajo haya llegado a buen puerto. Mil gracias a los tres, y sentíos tan partícipes como yo de todo esto.

Gracias también a todos mis compañeros de trabajo durante todos estos años. Sería imposible acordarme individualmente de cada colega, tanto de la Universidad de Salamanca como del IVIA, que me ha prestado su ayuda para la elaboración de este trabajo, así que, simplemente, gracias a todos aquellos que se sientan aludidos y, especialmente, a los que hoy puedan decir que se consideran mis amigos.

No puedo tampoco olvidarme de todos aquellos amigos que, siendo ajenos a la tesis (en principio), han sido parte de ella de manera indirecta, soportándome, ayudándome a evadirme o simplemente haciéndome el día a día más llevadero. Amigos de Gijón y de Salamanca, de toda la vida o más recientes, pero que han estado ahí cuando lo he necesitado.

Por supuesto, mil gracias también a Laura. Tu apoyo en estos últimos meses ha sido, simplemente, fundamental. Sabes que un cachito de mi tesis (y de mi salud mental) te lo debo a ti.

Y, finalmente, como no podía ser de otra forma, también me gustaría dar las gracias a mis directores, Pepe, Paco, Beatriz y Josep Daniel. Han sido años de trabajo muy intenso y puedo decir con orgullo que no he tenido ni un mal día con vosotros ni me he llevado un mal gesto por vuestra parte. Gracias por vuestra paciencia, por aportarme tanto conocimiento y por el tiempo que me habéis dedicado. Si hoy soy un poco más sabio que allá por diciembre del 2011, es por vosotros.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO INTRODUCTORIO	7
1. ANTECEDENTES	9
1.1. LAS PLAGAS AGRÍCOLAS	11
1.1.1. Concepto y origen	11
1.1.2. Daños causados por las plagas agrícolas.....	12
1.1.3. Métodos de control de plagas.....	13
1.1.3.1. Control químico de plagas.....	14
1.1.3.2. Lucha, Manejo o Gestión integrada de plagas.....	17
1.1.4. Principales grupos de fitófagos plaga.....	18
1.1.4.1. Los insectos fitófagos en España.....	20
1.2. LA MOSCA MEDITERRÁNEA DE LA FRUTA: <i>Ceratitis capitata</i> (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)	21
1.2.1. Situación taxonómica	21
1.2.2. Origen y distribución geográfica.....	22
1.2.3. Morfología y biología	23
1.2.4. Plantas hospedadoras	26
1.2.5. Importancia económica y daños.....	26
1.2.6. Métodos de control.....	28
1.2.6.1. Métodos culturales	29
1.2.6.2. Métodos físicos.....	29
1.2.6.3. Control químico.....	29
1.2.6.4. Control técnico o semioquímico.....	30
1.2.6.5. Lucha autocida o técnica del insecto estéril (TIE)	31
1.2.6.6. Control biológico.....	32
1.3. CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Ceratitis capitata</i> POR MEDIO DE PARASITOIDES	36
1.4. <i>Aganaspis daci</i> (WELD) (HYMENOPTERA: FIGITIDAE)	39
1.4.1. Situación taxonómica	39
1.4.2. Morfología y biología	39
1.4.3. Origen, distribución y uso como agente de control biológico.....	40

ÍNDICE DE CONTENIDOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS	43
2.1. INSTALACIONES	45
2.1.1. Instalaciones de campo	45
2.1.2. Instalaciones de semicampo	46
2.1.3. Laboratorios	47
2.2. MATERIAL	49
2.2.1. Recipientes	49
2.2.1.1. Recipientes de cría.....	49
2.2.1.2. Recipientes para ensayos.....	51
2.2.2. Alimento.....	53
2.2.3. Sustrato artificial	53
2.2.4. Sistemas de medida de variables ambientales.....	53
2.3. SISTEMAS DE CRÍA ARTIFICIAL DE <i>Ceratitis capitata</i> Y <i>Aganaspis daci</i> ..	54
2.3.1. Cría de <i>Ceratitis capitata</i>	54
2.3.2. Cría de <i>Aganaspis daci</i>	57
2.4. MÉTODOS	59
2.4.1. Recogida de parasitoides y depósito en unidades de ensayo.....	59
2.4.2. Ofrecimiento de larvas de <i>Ceratitis capitata</i> al parasitoide	59
2.4.2.1. Ofrecimiento de larvas en dieta.....	60
2.4.2.2. Ofrecimiento de larvas en fruta	61
2.4.3. Recuperación y seguimiento de las larvas ofrecidas.....	64
2.5. ANÁLISIS DE DATOS Y METODOLOGÍA ESPECÍFICA.....	64
3. REFERENCIAS	65
OBJETIVOS.....	83
CAPÍTULO 1 “First field record and surveillance of <i>Aganaspis daci</i> on citrus fields affected by <i>Ceratitis capitata</i> in Spain”	87
CAPÍTULO 2 “Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in <i>Aganaspis</i> parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies”	93

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 3 “Effect of temperature on the developmental time, survival of immatures and adult longevity of <i>Aganaspis daci</i> (Hymenoptera: Figitidae), a natural enemy of <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae)”	127
CAPÍTULO 4 “Biology of <i>Aganaspis daci</i> (Hymenoptera: Figitidae), parasitoid of <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae): mode of reproduction, biological parameters and superparasitism”	147
CAPÍTULO 5 “Parasitism of <i>Aganaspis daci</i> against <i>Ceratitis capitata</i> under Mediterranean climate conditions”	153
CAPÍTULO 6 “Effect of host density and location on the percentage parasitism, fertility and induced mortality of <i>Aganaspis daci</i> (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of <i>Ceratitis capitata</i> (Diptera: Tephritidae)”	173
CONCLUSIONES	197

CAPÍTULO INTRODUCTORIO

1. ANTECEDENTES

1.1. LAS PLAGAS AGRÍCOLAS

1.1.1. Concepto y origen

En un sentido amplio, el concepto de “plaga agrícola” podría definirse como todo aquel animal o planta adventicia que causa daño o perjuicio a los cultivos y, más concretamente, a la utilidad de éstos para el hombre (Cisneros, 1995; García-Marí y Ferragut, 2002).

Aquellos animales que se alimentan de plantas son los denominados “fitófagos”; en ocasiones, los fitófagos causan daños a los cultivos y estos daños pueden traducirse en pérdidas económicas para el hombre. Así, cuando estos daños llegan al grado de “daño económico” (definido por Stern *et al.* (1959) como la cantidad de daño que justifica el costo de medidas artificiales de control), hablamos de “plagas económicas”. De este modo, desde el punto de vista de la agricultura, actualmente los términos “plaga económica” y “plaga agrícola” son prácticamente sinónimos, de tal modo que aquellos organismos que no llevan a alcanzar el daño económico o que directamente son inocuos para los cultivos son simplemente conocidos como “fitófagos” (Cisneros, 1995).

El hecho de que un fitófago llegue a alcanzar o no el nivel de plaga depende de muy diversas cuestiones, como, por ejemplo, el nivel poblacional de la especie o el estado del cultivo. Hoy en día se considera que existen 2 tipos distintos de factores que determinan que un organismo fitófago se pase a considerar como plaga agrícola: a) factores *ecológicos* (relacionados con alteraciones de las propias plantas o el ecosistema) y b) factores *económicos* (relacionados con cambios a nivel social) (García-Marí y Ferragut, 2002).

a) Como factores ecológicos que pueden conducir a la aparición de plagas, podríamos destacar los siguientes:

- La dispersión de cultivos y fitófagos por acción humana, que puede llevar a fenómenos de introducción o incluso invasión de dichos fitófagos. Así, puede ocurrir que un fitófago colonice nuevas áreas donde no estén presentes sus enemigos naturales, disparándose su crecimiento; o puede ocurrir también que los fitófagos autóctonos se adapten a cultivos introducidos y se multipliquen sobre ellos.
- La alteración de la diversidad causada por la agricultura; ciertas prácticas agrícolas (por ejemplo, el uso de plaguicidas) reducen la diversidad específica de fitófagos, de manera que aquellos que sobrevivan a estas prácticas se verán liberados de la competencia y se podrán desarrollar de forma exponencial. Además, estas prácticas también pueden

alterar el control biológico natural, es decir, el equilibrio existente entre plagas y enemigos naturales, dando lugar a proliferaciones de fitófagos perjudiciales.

- El impulso del monocultivo: si una sola especie vegetal es adecuada para un determinado fitófago, y se cultiva de manera extensiva, puede proporcionar una fuente de alimento ilimitada para éste favoreciendo su crecimiento poblacional.
- La selección de variedades de mayor nivel nutritivo, que se corresponde con el impulso de cultivos también más adecuados para el desarrollo de fitófagos.

b) Como factores económicos que puedan llevar a considerar como plaga a una población determinada de fitófagos, destacaríamos:

- Cambios en los costes de producción; en ocasiones, fitófagos secundarios, sin efectos directos sobre la especie vegetal a producir, pueden dificultar ciertas labores agrícolas incrementando los costes de su producción y pasando a ser considerados como plagas.
- Cambios en la demanda; modificaciones en la demanda de un determinado producto pueden conducir a cambios en su valor de mercado y, consecuentemente, a alteraciones en la consideración del daño producido por las plagas sobre ese cultivo determinado.

1.1.2. Daños causados por las plagas agrícolas

Hoy día se estima que, aproximadamente, un 30% de la cosecha mundial se pierde antes de su recolección por la acción de plagas animales, patógenos y malas hierbas (Oerke, 2006). De ese 30%, aproximadamente la mitad (un 14% del total) se debe a la acción de artrópodos perjudiciales, especialmente a los incluidos en el grupo de los insectos. Además, tras la recolección, los productos almacenados también pueden sufrir el efecto de animales perjudiciales, tanto insectos como animales superiores.

Tradicionalmente, se han dividido los daños causados por las plagas agrícolas en dos tipos: a) daños *directos* (los que causa el fitófago al vegetal por su propia acción) y b) daños *indirectos* (los producidos por otros organismos cuya acción resulta inducida por efecto del fitófago).

a) En cuanto a los daños directos, pueden ser de los siguientes tipos según la parte afectada de la planta (García-Marí y Ferragut, 2002):

- Daños a nivel foliar: suelen estar producidos por insectos, bien por acción masticadora o bien por acción chupadora. La acción de estos insectos puede manifestarse en forma de

roturas, galerías, enrollamientos de la lámina foliar o decoloraciones derivadas de la ingestión de clorofila, entre otros efectos visibles.

- Daños a nivel del tallo: el interior del tallo de las plantas herbáceas, o el tronco y las ramas de plantas leñosas, pueden albergar pequeños artrópodos que atacan estas estructuras vegetales.
- Daños a nivel de raíces y tubérculos: diversas especies de animales de vida subterránea pueden causar daños a las partes hipogeas de la planta.
- Daños de brotes o yemas: típicamente causados por insectos minadores o masticadores; dan lugar a agallas, deformaciones u otras alteraciones del desarrollo.
- Daños en fruto y semillas: numerosos organismos, normalmente artrópodos, se alimentan de semillas y/o frutos e incluso se alojan en su interior, dando lugar a manchas necróticas, deformaciones, caída prematura del fruto, etc.
- Daños post-cosecha: daños causados sobre semillas, frutos, etc. que se encuentran almacenados después de la cosecha.

b) Con respecto a los daños indirectos, destaca, en este sentido, la acción de organismos patógenos transmitidos a la planta por los fitófagos, dando lugar a enfermedades. Las enfermedades de las plantas consistirían en respuestas de las células y tejidos vegetales, normalmente a microorganismos patogénicos (=infecciosos: bacterias, virus y hongos), que determinan un cambio adverso en la forma, función o integridad de la planta y pueden conducir a una incapacidad parcial o a la muerte de dicho vegetal (Agrios, 1997). En este sentido, numerosos factores ambientales (no infecciosos) también pueden conducir a que las plantas sufran enfermedades, pero, en su caso, no existe relación alguna con organismos fitófagos, es decir, éstos no actúan como vectores de la enfermedad. Otro ejemplo de daños indirectos serían, por ejemplo, los derivados de la producción de ciertas secreciones como la melaza, que puede atraer a otros organismos (principalmente fúngicos) que desarrollen una actividad nociva para la planta.

1.1.3. Métodos de control de plagas

En general, se considera que el control de una plaga consiste en mantener su densidad de población por debajo del nivel en el cual comienza a causar perjuicio económico (Cisneros, 1995). Históricamente han sido muchos los métodos de control empleados contra las plagas agrícolas, resultando especialmente interesante el cambio progresivo que en los últimos años ha

acontecido con respecto al uso de unas u otras técnicas como principales estrategias de control (Jacas y Urbaneja, 2008; Tormos y Portillo, 2014).

En este sentido, los métodos indirectos (legislación fitopatológica, obtención de variedades resistentes, alternancia de cosechas), los métodos mecánicos (recogida manual de insectos, descortezado, construcción de refugios artificiales) y las prácticas de cultivo (riegos, drenajes, uso y posterior destrucción de plantas cebo) han sido, tradicionalmente, los métodos más comúnmente empleados en el control de plagas agrícolas (Domínguez García-Tejero, 1989); sin embargo, algunas de estas técnicas, especialmente las más rudimentarias, quedarían prácticamente en desuso durante gran parte del siglo XX en favor de la lucha química (Domínguez García-Tejero, 1989; García-Marí y Ferragut, 2002). El control químico constituyó, durante varias décadas del siglo pasado, el método más general y conocido de lucha contra las plagas de los cultivos. En los últimos años, sin embargo, por la gran cantidad de efectos adversos que conlleva, este método de control ha sido progresivamente sustituido como principal estrategia de control por un compendio de métodos, más aconsejables a nivel económico, ecológico y toxicológico, que constituyen la llamada “Lucha Integrada”, “Manejo Integrado de Plagas” o “Gestión Integrada de Plagas”.

Por su relevancia en tiempos pasados y en la actualidad, a continuación se detalla brevemente la historia, evolución y situación actual del control químico y la lucha integrada.

1.1.3.1. Control químico de plagas

El control químico de las plagas se define como la contención de sus poblaciones o la prevención de su desarrollo mediante el uso de sustancias químicas, llamadas pesticidas o plaguicidas (Cisneros, 1995).

El uso de productos químicos para el control de plagas agrícolas vivió su mayor auge a lo largo del siglo XX y, más concretamente, en la segunda mitad de dicho siglo. El descubrimiento de la acción plaguicida de los productos orgánicos de síntesis y la aparición de los primeros plaguicidas comerciales de esta índole en el año 1946 dieron inicio a una época en la que el consumo de estos compuestos fue en aumento de manera progresiva (Domínguez García-Tejero, 1989; García-Marí y Ferragut, 2002).

Los plaguicidas orgánicos de síntesis son sustancias muy eficaces, y facilitan un control rápido, simple y que proporciona resultados seguros; sin embargo, la acción de estos productos es transitoria, es decir, deben ser aplicados periódicamente para mantener las plagas bajo control; y, además, su uso continuado puede dar lugar a la aparición de plagas secundarias (Tormos y Portillo, 2014) y generar resistencias en las plagas (Ortego *et al.*, 2005),

contaminación ambiental (Mañosa *et al.*, 2001) y toxicidad en otros seres vivos, incluyendo al ser humano (Flessel *et al.*, 1993).

Es por estos motivos que esa tendencia al alza que tenía el uso de plaguicidas en las décadas de los '50 y los '60 está cambiando, especialmente en los países más desarrollados. Grandes potencias como los Estados Unidos o países punteros europeos están reduciendo considerablemente el consumo de estos productos, y las leyes para el uso de productos fitosanitarios son cada vez más restrictivas. Además, actualmente, dentro del uso de productos químicos para el control de plagas, se está potenciando el uso de plaguicidas específicos en lugar de los de amplio espectro, pues resultan más respetuosos con las poblaciones auxiliares a las plagas y pueden ser empleados de manera conjunta con otros métodos de control (García-Marí y Ferragut, 2002).

Respecto a nuestro país, España actualmente sigue encontrándose por detrás de otros países europeos, como Francia o Italia, en cuanto al consumo de productos fitosanitarios se refiere; en el año 2015, la comercialización total de éstos en nuestro país rondó las 77.000 toneladas, de las que aproximadamente el 9% correspondía a productos estrictamente plaguicidas como los insecticidas y acaricidas (MAPAMA, 2017a) (**Fig. 1.1**); dentro de los insecticidas, los organofosforados y los piretroides siguen siendo los productos más vendidos, manteniendo la tendencia de los últimos años (**Fig. 1.2**). Además, analizando la tendencia de los tres últimos años de los que se tienen datos, se aprecia que los insecticidas y acaricidas se encuentran bastante estabilizados en cuanto a su consumo se refiere, al contrario que los herbicidas y, sobre todo, los fungicidas y bactericidas, cuya comercialización ha crecido de manera considerable (**Fig. 1.3**). Estos datos nos dan una medida de la importancia relativa de cada tipo de plaga o problema fitosanitario en nuestro país, y de la tendencia seguida en cuanto a los métodos de control empleados en cada caso.

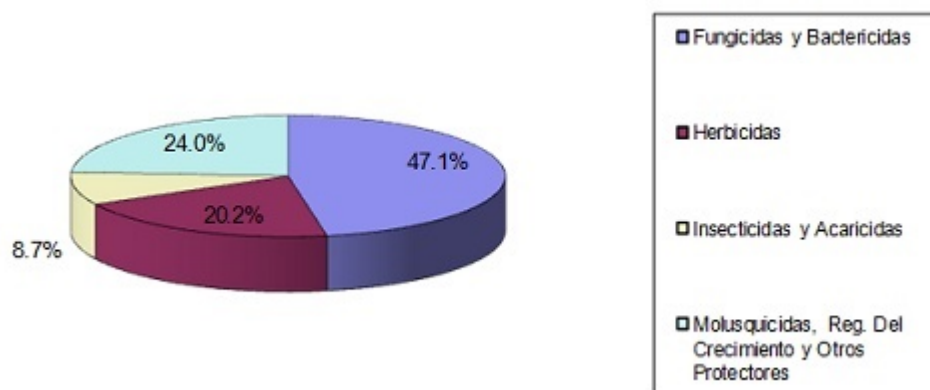


Figura 1.1. Proporción de las principales categorías de fitosanitarios comercializados en España durante 2015. Fuente: MAPAMA, 2017.

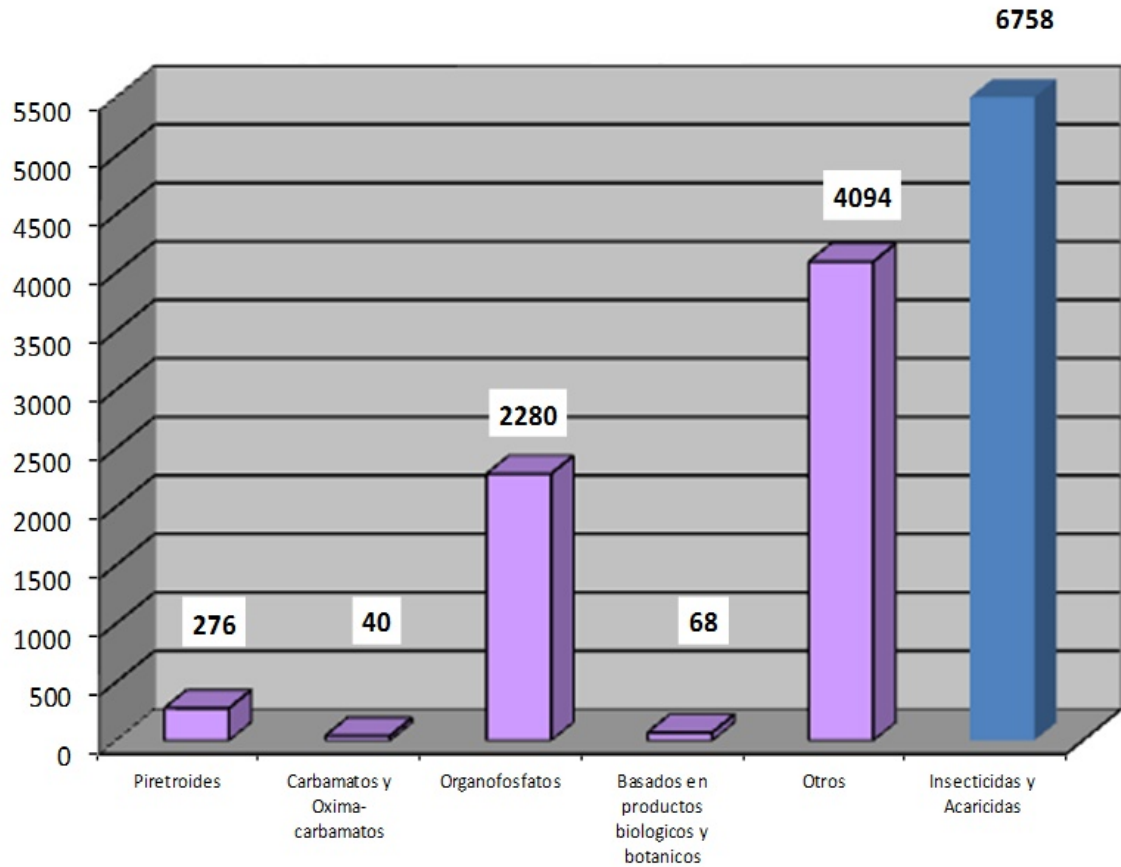


Figura 1.2. Cantidad comercializada, en toneladas, de las principales categorías de insecticidas y acaricidas en España durante 2015. Fuente: MAPAMA, 2017.

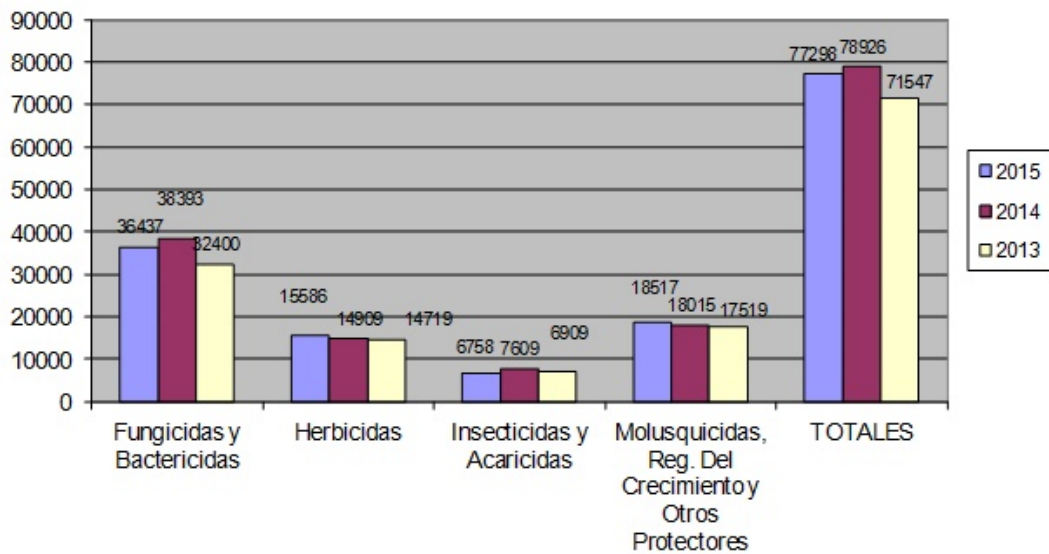


Figura 1.3. Comparativa, entre los años 2013, 2014 y 2015, de las cantidades comercializadas (en toneladas) de los principales grupos de fitosanitarios en España. Fuente: MAPAMA, 2017.

1.1.3.2. Lucha, Manejo o Gestión integrada de plagas

El empleo abusivo del control químico, así como los efectos nocivos vinculados a éste que hemos citado anteriormente (contaminación ambiental, aparición de plagas resistentes, eliminación de fauna útil) llevaron al planteamiento, ya en el siglo pasado, de una nueva estrategia de control más respetuosa a todos los niveles: la Lucha, Manejo o Gestión Integrada de Plagas.

Smith y Reynolds (1966), dos de los principales impulsores de esta estrategia, definieron, en un simposio de la FAO, la Gestión Integrada de Plagas como “un sistema de manejo de poblaciones de plagas que emplea todas las técnicas disponibles de forma compatible para reducir dichas poblaciones y mantenerlas a niveles inferiores a los que causan daño económico”.

Así, actualmente y desde finales de siglo pasado, las tendencias en protección de cultivos se han centrado, en la mayoría de los países y particularmente en la Unión Europea, en el uso conjunto de todos los métodos de control disponibles con el fin de implantar una agricultura sostenible que permita la producción de alimentos de calidad de una forma económica, socialmente aceptable y respetuosa con el medio ambiente. Legalmente, en España ya se ha implantado la aplicación de forma general de la Gestión Integrada de Plagas (GIP), a través del Real Decreto 1311/2012 de 14 de septiembre (BOE nº 223, de 15 de septiembre de 2012), definiéndose a la GIP en este caso como "el examen cuidadoso de todos los métodos de protección vegetal disponibles y la posterior integración de medidas adecuadas para evitar el desarrollo de poblaciones de organismos nocivos y mantener el uso de productos fitosanitarios y otras formas de intervención en niveles que estén económica y ecológicamente justificados y que reduzcan o minimicen los riesgos para la salud humana y el medio ambiente".

Hoy en día, este compendio de estrategias se considera como la única vía que puede permitir solucionar los problemas de plagas de manera racional y a largo plazo (Flint y Van den Bosch, 1983; Garrido y Ventura, 1993; Jacas y Urbaneja, 2008; Tormos y Portillo, 2014). Como se ha comentado anteriormente, su objetivo en última instancia no es la erradicación total de la plaga, sino que la densidad de ésta se mantenga por debajo del umbral que causa daño económico (denominado “Umbral Económico de Daño” por Stern *et al.* (1959)); para ello, considerando todas las plagas y enemigos naturales del cultivo dado, se seleccionan métodos de control a aplicar de tal modo que se complemente la acción de los agentes de control naturales, buscando resultados a largo plazo y una minimización de los costes económicos y ecológicos (Flint y Van den Bosch, 1983; Garrido y Ventura, 1993). Por lo tanto, para poderse llevar a cabo de manera exitosa, la GIP requiere de una serie de conocimientos previos a la actuación, tales como la identificación y valoración de la importancia de los fitófagos presentes en el cultivo

dado, o la determinación del umbral económico de daño por debajo del cual deseamos establecer la población de la plaga (Garrido y Ventura, 1993; Jacas y Urbaneja, 2008; Urbaneja *et al.*, 2012).

Los diferentes métodos de control que se aúnan en las estrategias empleadas en la GIP serían los siguientes (Urbaneja *et al.*, 2012):

- Métodos legales: aplicación de cuarentenas para la prevención de la difusión y propagación de especies dañinas aún no presentes en un país determinado.
- Métodos culturales: prácticas agrícolas que, de una manera u otra, impidan la proliferación de plagas o faciliten su erradicación: podas, riegos, abonados...
- Uso de variedades resistentes a plagas.
- Métodos físicos: modificación del medio ambiente físico donde se encuentra la plaga para evitar su efecto nocivo, bien generando niveles de estrés que perturben o maten a la plaga, o bien a través de barreras físicas que protejan a las plantas de posibles ataques.
- Métodos químicos: la lucha química, empleada de manera racional y compatible con los métodos antes citados, tiene también cabida en este tipo de estrategias.
- Métodos biológicos: empleo de enemigos naturales (depredadores, parasitoides, patógenos) de una plaga dada con el fin de reducir sus niveles poblacionales.

De todos estos métodos, el control biológico y, por ende, la lucha biológica (ver apartado 1.2.6.6) constituyen hoy en día una de las estrategias clave dentro del manejo integrado de plagas por su extremo respeto medioambiental y la ausencia de efectos negativos (Van Driesche y Bellows, 1996).

1.1.4. Principales grupos de fitófagos plaga

Como plagas agrícolas se encuentran representantes de los siguientes grupos de animales (Bonnemaison, 1964; Domínguez García-Tejero, 1989; García-Marí y Ferragut, 2002; Jacas *et al.*, 2005; Jacas y Urbaneja, 2008; Tormos y Portillo, 2014):

- Phylum CHORDATA: dentro de los cordados, dos clases pueden causar daños de manera especialmente importante a los cultivos: las aves y los mamíferos (NAS, 1978).

En cuanto a las aves se refiere, varios representantes del Orden Passeriformes pueden resultar dañinos para los cultivos al alimentarse de semillas o frutos. Sin embargo, la mayoría de aves resultan beneficiosas por sus hábitos insectívoros, e incluso algunas

especies pueden ser, al mismo tiempo, causantes de daño agrícola y beneficiosas al alimentarse de insectos y pequeños mamíferos (Wright *et al.*, 1980).

Respecto a los *mamíferos*, existen varios grupos de esta clase con interés agrícola, como podrían ser los órdenes Insectivora (p.e. erizos, musarañas, topos), Lagomorpha (p.e. conejos, liebres) y Rodentia (p.e. ratas, ratones, topos) (Gosálbez, 1987). Estos dos últimos grupos son especialmente nocivos para los cultivos, al alimentarse de vegetales cultivados o almacenados (Greaves, 1984).

- Phylum MOLLUSCA: algunos gasterópodos pulmonados, tales como los caracoles y las babosas, pueden producir daños a plantas hortícolas, ornamentales e incluso a plantaciones de cítricos, especialmente en zonas húmedas (Godan, 1983).
- Phylum ARTHROPODA: es el grupo que alberga a un mayor número de especies con relevancia agrícola, debido a su enorme diversidad. Los diferentes grupos de artrópodos que pueden constituir plagas de naturaleza agrícola son los siguientes (Domínguez García-Tejero, 1989; García-Marí y Ferragut, 2002; Jacas *et al.*, 2005; Tormos y Portillo, 2014):
 - CRUSTACEA: sólo algunos crustáceos terrestres del orden Isopoda (las llamadas “cochinillas de la humedad”) pueden causar daños agrícolas, con una relevancia mínima como plaga (Domínguez García-Tejero, 1989).
 - MYRIAPODA: ciempiés y milpiés también tienen escasa importancia agrícola, limitada a algunas especies que afectan a semillas en germinación y plántulas (Domínguez García-Tejero, 1989).
 - ARACHNIDA: dentro del extenso grupo de los arácnidos, sólo tienen relevancia a modo de plagas agrícolas los llamados “ácaros”, grupo constituido por dos superórdenes diferentes: Actinotrichida (=Acariformes) y Anactinotrichida (=Parasitiformes). De ellos, una pequeña proporción de Acariformes puede actuar como plaga en cultivos por haber desarrollado un estilete en el aparato bucal que les permite alimentarse de tejidos vegetales (Jeppson *et al.*, 1975; García-Marí *et al.*, 1991; Evans, 1992); especialmente relevantes en este sentido son las familias Tetranychidae, Eriophyidae y Tarsonemidae.

Por otro lado, dentro de los ácaros, además de especies plaga también hay otras especies con relevancia agrícola pero, en este caso, beneficiosas. Es el caso de formas depredadoras del superorden Parasitiformes que son capaces de controlar poblaciones de ácaros plaga y pequeños insectos, de entre las cuales

destacaríamos al grupo de los fitoseidos (Familia Phytoseiidae) (García-Marí *et al.*, 1991; Evans, 1992; Jacas *et al.*, 2005; Jacas y Urbaneja, 2008).

- INSECTA: sin lugar a dudas, los insectos engloban a la mayor parte de las plagas agrícolas hoy en día conocidas. Esto se explica teniendo en cuenta la enorme diversidad existente en este grupo; si los artrópodos incluyen al 80% de las especies del reino animal, la inmensa mayoría de artrópodos son insectos, de modo que el 75% de especies animales hoy en día conocidas pertenecen a este grupo animal. Se estima que el número de especies de insectos descritas en la actualidad supera el millón, a sumar todas aquellas que aún están por descubrir (Davies, 1991; Tormos y Portillo, 2014). Además de esta gran diversidad específica, el grupo de los insectos muestra una enorme variedad en cuanto a formas, tamaños, comportamientos y formas de vida, lo cual les permite adaptarse a todo tipo de ambientes y llevar a cabo su colonización (Daly *et al.*, 1978; Davies, 1991). Así, los insectos se han convertido, históricamente, en grandes competidores del hombre, y son los organismos animales que mejor aprovechan las condiciones favorables que el propio hombre crea para los cultivos. Dada la relevancia que tiene este grupo en la presente tesis doctoral, se le dedica un epígrafe propio (ver siguiente apartado 1.1.4.1).

1.1.4.1. Los insectos fitófagos en España

En nuestro país, el número de especies de insectos descritas a día de hoy supera las 50.000, de las cuales unas 200 pueden considerarse como plagas agrícolas más o menos relevantes (García-Marí y Ferragut, 2002). Es decir, pese a ser el grupo que representa un mayor número de plagas agrícolas, el porcentaje de insectos verdaderamente dañinos para la agricultura no resulta tan elevado; y, de hecho, dentro de los insectos hay una gran cantidad de especies que son incluso beneficiosas desde el punto de vista agrícola. Algunas de estas especies son capaces de regular poblaciones de insectos fitófagos; se trata de los enemigos naturales, bien depredadores o bien parasitoides, que se emplean frecuentemente en el control biológico de plagas (De Bach y Rosen, 1991; Van Driesche y Bellows, 1996). Otras especies de insectos también pueden reportar beneficios a la agricultura, en este caso contribuyendo a la polinización, en un fenómeno que es fundamental para la producción de multitud de plantas cultivadas (Crane, 1972; Gauld y Bolton, 1988; Viejo-Montesinos y Ormosa-Gallego, 1997).

Entre las especies de insectos que causan plaga en España, destacan los representantes de los órdenes Hemiptera, Lepidoptera, Coleoptera, Thysanoptera, Hymenoptera y Diptera (Domínguez García-Tejero, 1989; García-Marí y Ferragut, 2002; Jacas *et al.*, 2005; Jacas y

Urbaneja, 2008; Tormos y Portillo, 2014). En este último orden cabe destacar a la familia Tephritidae, en la que se encuadran la mayoría de las llamadas “moscas de las frutas”.

Los tefrítidos son un grupo muy diverso (aproximadamente 5000 especies) de dípteros muy abundantes en zonas templadas y cálidas de todo el mundo. Incluyen a numerosas especies plaga en cultivos frutícolas, ya que sus hembras depositan sus huevos en frutos maduros, flores, hojas o tallos, en los que las larvas se alimentan y desarrollan (García-Marí y Ferragut, 2002). Como especies más dañinas de tefrítidos en nuestro país destacaríamos a la mosca de la cereza *Rhagoletis cerasi* (Linnaeus, 1758); a la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790), muy extendida por la Cuenca Mediterránea y que constituye una de las principales amenazas del cultivo del olivo a nivel mundial, y a la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), que es una plaga clave de numerosos frutales no sólo en nuestro país, sino en todo el mundo.

La contribución a la lucha biológica contra esta última especie, en concreto a través del himenóptero figítido *Aganaspis daci* (Weld, 1951), constituye el objetivo fundamental de esta tesis de doctorado.

1.2. LA MOSCA MEDITERRÁNEA DE LA FRUTA: *Ceratitis capitata* (WIEDEMANN) (DIPTERA: TEPHRITIDAE)

1.2.1. Situación taxonómica

Según de Jong *et al.* (2017), el encuadre taxonómico de *Ceratitis capitata* es el siguiente:

Clase HEXAPODA

Subclase INSECTA

Orden DIPTERA

Suborden BRACHYCERA

Familia TEPHRITIDAE

Género *Ceratitis* MacLeay, 1829

Especie *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824)

Actualmente, el nombre vulgar más empleado es “medfly” o “mosca del mediterráneo”, ya que, pese a no ser originaria de la zona, fue en la Cuenca Mediterránea donde se citó por primera vez como plaga de frutales, y es aquí donde se manifiesta en mayor medida su incidencia económica (Ros, 1988).

1.2.2. Origen y distribución geográfica

Hoy día se cree que el origen de esta especie de díptero es la zona occidental tropical de África, por haberse encontrado allí más de 20 especies diferentes del género *Ceratitis* MacLeay, 1829 (Ruiz Castro, 1945; Moner *et al.*, 1988).

El paso a nuestro país se cree que habría tenido lugar a través del bosque de argán de la costa mediterránea de Marruecos, constituyendo dicho paso el origen del foco mediterráneo (Moner *et al.*, 1988; Ros, 1988). De la Cuenca Mediterránea se cree que se extendería de manera natural al resto del continente europeo, y de manera indirecta (probablemente a través del comercio de frutas infestadas) llegaría a extenderse hacia Australia y Sudamérica a principios del siglo XX, y más tarde a Centro y Norteamérica (Metcalf, 1995; Davies *et al.*, 1999). Hoy en día se considera una especie cosmopolita, especialmente abundante en las regiones templadas, subtropicales y tropicales del planeta (EPPO, 2017) (**Fig. 1.4**).

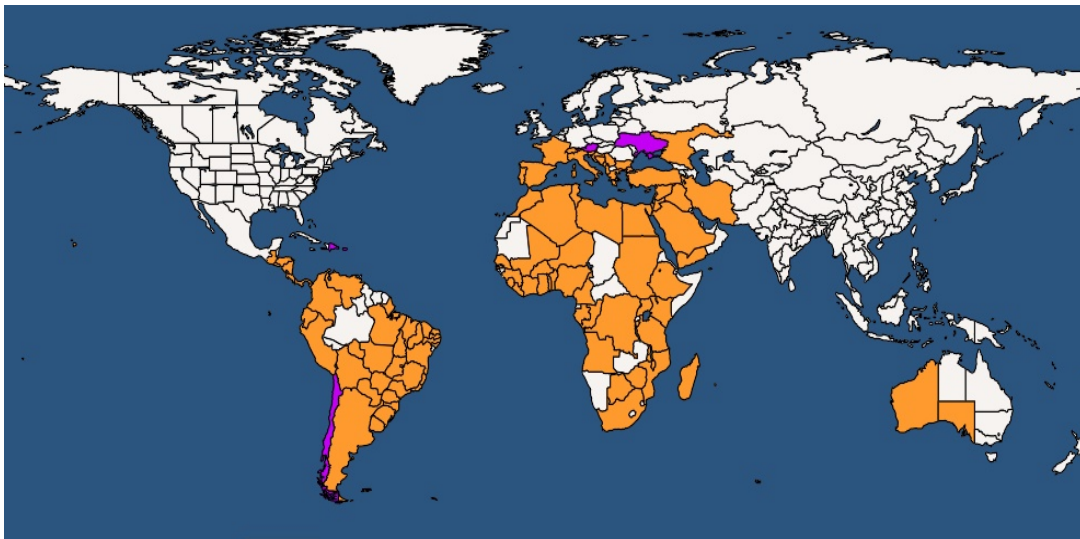


Figura 1.4. Mapa de distribución mundial de *Ceratitis capitata*. En naranja, países y/o zonas donde la especie se encuentra presente y asentada. En violeta, países en los que la presencia de esta especie es transitoria. Fuente: EPPO, 2017.

Esta gran dispersión dada por el transporte internacional de productos agrícolas afectados por la plaga, y, en mucho menor grado, por la migración natural del insecto (Back y Pemberton, 1918) se ha visto impulsada, además, por la ausencia de enemigos naturales que

puedan controlar de manera efectiva a la mosca, por el alto potencial de reproducción de ésta y por la gran variedad de plantas hospedadoras que puede utilizar. De este modo, hoy en día se considera la plaga más importante de cítricos en regiones tropicales y subtropicales (Papadopoulos *et al.*, 1996).

En España, se citó por primera vez por De Brême en 1842, sin considerarse como especie plaga hasta 1924. En la actualidad, es una especie presente tanto en la Península, como en los archipiélagos de las Canarias y Baleares (Moner *et al.*, 1988). Su presencia en el norte y en las zonas frías está más restringida, y se cree que se debería a invasiones temporales desde zonas cálidas de invernada (Del Pino, 2000) o incluso a que sea una especie capaz de invernar en zonas frías (Peñarrubia-María, 2010).

Se ha establecido que el límite climatológico que determina su distribución es la isoterma 13.5 °C, es decir, entre los paralelos 40°N y 39°S (Bodenheimer, 1951).

1.2.3. Morfología y biología

La metamorfosis de esta especie, como la de tefrítidos y dípteros en general, es de tipo holometábolo. Su ciclo biológico consta de 4 fases (huevo, larva, pupa y adulto), teniendo cada una de ellas una duración variable y dependiente de la temperatura y otros factores; por ejemplo, más de la mitad de los imagos o adultos mueren antes de cumplir las 8 semanas de vida, si bien bajo ciertas condiciones (bajas temperaturas, disponibilidad de agua y alimento) su longevidad puede llegar a superar los 6 meses (Duyck y Quilici, 2002; Thomas *et al.*, 2010).

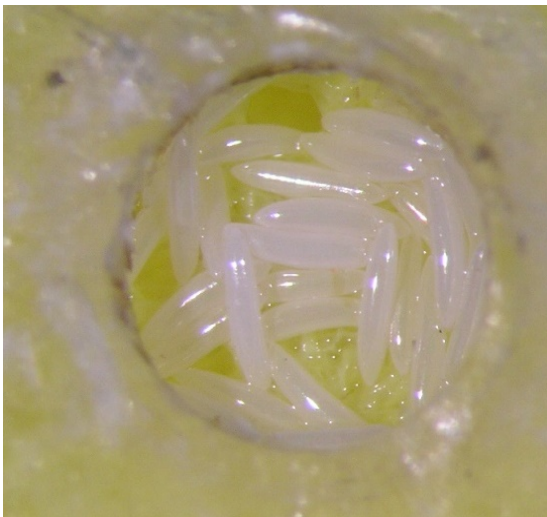


Figura 1.5. Huevos de *Ceratitís capitata*.
Fotografía: Francisco Beitia.

Generalmente, las hembras adultas comienzan a poner huevos en torno a los 5-10 días de vida, al ser fecundadas, disponiendo los huevos bajo la piel del fruto hospedador, lo cual les confiere alimento y protección.

El **huevo** de *C. capitata* (**Fig. 1.5**) tiene una longitud de en torno a 1 mm de largo (unas 5 veces su anchura) y es ovoideo, siendo inicialmente blanquecino y tendiendo a adquirir coloración amarilla con el paso de los días (Ros, 1988). La eclosión se produce a los 2-4 días, pudiendo prolongarse hasta más de 15 días en climas fríos.

Los **estados larvarios** son ápodos y mucidiformes (es decir, con el extremo posterior más ensanchado que el anterior, que es más agudo e incluye a la cabeza), se constituyen de 11 segmentos y pueden alcanzar los 10 mm de longitud en su última fase. Tienen un color blanquecino o amarillento, aunque en ocasiones se pueden ver tonalidades rojizas u oscuras si su tubo digestivo está lleno de alimento. Durante la fase larvaria se presentan dos mudas, lo cual determina que existan tres estados. Dichos estados (denominados L1, L2 y L3) se



Figura 1.6. Larva L3 de *Ceratitidis capitata*, sobre la superficie del fruto infestado, preparada para saltar y pupar. Fotografía: Francisco Beitia.

diferencian entre sí en la morfología que presenta el “gancho” u esqueleto céfalo-faríngeo de su aparato bucal; así, la fase L1 carece de dientes en dicho “gancho”; la L2 tiene dos dientes y, en el caso de la L3, ésta sólo conserva un diente, en concreto el exterior. La larva L1, nada más emerger, comienza a penetrar hacia el interior del fruto, excavando galerías donde quedan cobijadas dichas larvas, en un entorno rico en alimento ya que se alimentan de la pulpa del fruto. Sufren las dos mudas y, en fase de L3 (longitud media: 7-9 mm (White y Elson-Harris, 1992)), la larva sale a la superficie (**Fig. 1.6**), salta por contracciones musculares y se entierra en el sustrato para pupar. La duración del periodo larvario oscila entre los 8 y los 10 días en climas templados.



Figura 1.7. Pupas de *Ceratitidis capitata*. Puede apreciarse el cambio de tonalidad según van madurando; las más jóvenes son blanquecinas (incluso puede apreciarse alguna larva L3); las más maduras muestran un color ocre oscuro. Fotografía: Francisco Beitia.

La **pupa** (**Fig. 1.7**) es blanquecina inicialmente, adquiriendo un color ocre a medida que va madurando, y tiene forma elipsoidal. Mide aproximadamente 4 x 2 mm (Thomas *et al.*, 2010) y se abre transversalmente en su parte antero-distal para dejar salir al adulto o imago. Esta fase pupal suele prolongarse durante, aproximadamente, unos 10 días.

El **adulto** emerge por esa parte antero-distal del pupario mediante la distensión del ptilino. Mide aproximadamente unos 5 mm y muestra, a nivel de tórax y abdomen, un bandeo negro, blanco y amarillo, con pilosidad torácica.

Sus ojos son grandes e iridiscentes, y las alas transparentes, con manchas ahumadas y tres bandas amarillentas. El dimorfismo sexual en esta especie se aprecia en la ovicauda triangular

que tienen las hembras en el extremo del abdomen, que utilizan para la perforación de la piel de los frutos y la puesta de los huevos (Mau y Kessing, 1992); y en el par de setas postoculares espatuladas que tienen los machos (**Fig. 1.8**). Este carácter dimórfico masculino sirve, además, como carácter taxonómico específico de este género, ya que la morfología de estas setas postoculares varía entre las diferentes especies de *Ceratitis*.

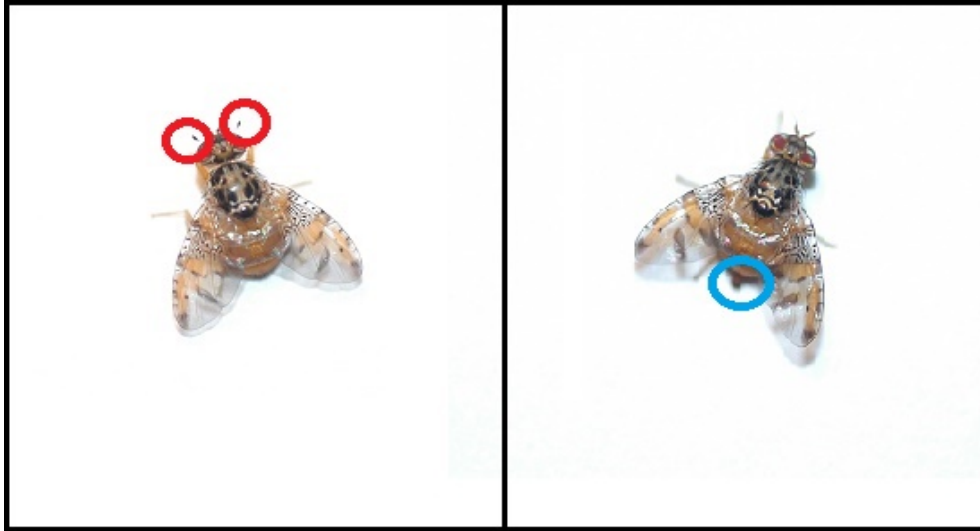


Figura 1.8. Macho (izquierda) y hembra (derecha) adultos de *Ceratitis capitata*. En rojo, setas postoculares en forma de espátula típicas de los machos de esta especie; en azul, ovicauda triangular exclusiva de las hembras. Fotografías: Francisco Beitia.

La alimentación de los adultos se compone, principalmente, de secreciones de melaza de homópteros, secreciones glandulares de las plantas, y néctar y jugo de los frutos (Christenson y Foote, 1960). Un mayor contenido de aminoácidos en su dieta lleva a que se acelere la madurez sexual de estos adultos; dicha madurez se alcanza a los 7-11 días en los machos y a los 8-12 en las hembras, tras lo cual se inicia el período reproductor (Shelly *et al.*, 2007). En dicho periodo tiene lugar la cópula, previa a la cual los machos, agrupados, emiten feromonas sexuales para atraer a las hembras. Una vez que se produce el encuentro entre machos y hembras, tiene lugar un cortejo en el que los machos aletean, mueven cabeza y abdomen e incluso emiten sonidos (Prokopy y Hendrichs, 1979). Tras la elección de pareja se produce la cópula (**Fig. 1.9**), que dura entre 2 y 3 horas (Whittier *et al.*, 1992) y en la cual se produce la transferencia de esperma (Seo *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 2001).



Figura 1.9. Macho y hembra de *Ceratitis capitata* durante el proceso de cópula. Fotografía: Francisco Beitia.

En la zona mediterránea *Ceratitis capitata* puede estar presente como adulto todo el año, pudiendo alcanzar un número de generaciones anuales de entre 6 y 8. Invernan (en concreto, entran en quiescencia) como larvas L2-L3 en el fruto, emergiendo las hembras de primera generación a finales de invierno; la segunda generación será en primavera; la tercera a principios de verano; la cuarta y quinta en verano central y finales de verano; y la sexta en otoño, de manera que si la temperatura es suave y hay frutos disponibles puede alcanzarse alguna generación más (Gómez-Clemente, 1932). En Europa central y del norte, las poblaciones son ocasionales y de vida corta, debido a las bajas temperaturas, que actúan como factor limitante (por ejemplo, la puesta no se realiza a temperaturas inferiores a 16 °C); la presencia de la mosca en estas zonas se debe únicamente a invasiones ocasionales desde zonas cálidas o a la introducción de frutos infestados.

La estrategia de vida de *C. capitata* incluye el cambio de especies hospedadoras a lo largo del año; esto se debe a que las larvas sólo se van a desarrollar en frutos maduros.

1.2.4. Plantas hospedadoras

Ceratitis capitata es una especie altamente polífaga, que se desarrolla sobre una amplia variedad de familias vegetales. Actualmente, son más de 350 especies vegetales las descritas como posibles hospederos de esta mosca, incluyendo a casi todos los frutales cultivados (Liquidó *et al.*, 1991; Batkin, 1995).

Hoy en día se considera como una especie plaga sobre cítricos, con una acción especialmente relevante sobre el naranjo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) o el mandarino (*Citrus reticulata* Blanco); sin embargo, no está especializada en su acción sobre éstos, manifestando preferencia sobre frutales de hueso y pepita, como el melocotonero (*Prunus persica* (L.) Batsch) (Moner *et al.*, 1988). Además, se ha visto que, en casos de superpoblación de la especie o de escasez de hospedadores, puede extenderse también a hortalizas como el pimiento, el tomate o las judías (Ros, 1988).

1.2.5. Importancia económica y daños

La amplia distribución y la gran diversidad de especies vegetales que puede usar como hospedero hacen que *Ceratitis capitata* sea considerada hoy en día como la especie de tefrítido más dañina a nivel mundial (White y Elson-Harris, 1992), siendo especialmente relevante, sobre todo en España, su acción sobre los cítricos.

Alrededor de 100 países en el mundo son productores de cítricos, con más de 7.4 millones de hectáreas (ha) dedicadas a su cultivo en zonas tropicales y subtropicales. Aproximadamente la mitad de esta superficie está dedicada a la producción de naranjas,

principal cítrico en cuanto a producción mundial seguido por la mandarina. La producción anual mundial de cítricos supera actualmente los 120 millones de toneladas (FAO, 2016).

A nivel europeo, hay cerca de 400.000 ha destinadas al cultivo de cítricos, si bien se estima que el total de frutales susceptibles al ataque de *C. capitata* ocupa en torno a 900.000 ha en todo el continente (Eurostat, 2012).

En cuanto a España, es, a día de hoy, el mayor productor de cítricos de la UE, y el sexto a nivel mundial tras China, Brasil, EEUU, México e India. La producción anual española, en los últimos años, está superando los 5 millones de toneladas anuales, de los que, además, un gran porcentaje (aproximadamente el 60%) va destinado a la exportación, siendo el mayor exportador de cítricos a nivel mundial (FAO, 2016). La superficie destinada al cultivo de los cítricos en España ronda las 310.000 ha, predominando el cultivo del naranjo, seguido por el mandarino y el limonero (MAPAMA, 2017b). Dentro de nuestro país, la región con mayor producción es la Comunidad Valenciana, con más de 182.000 ha destinadas al cultivo de cítricos (60% nacional) y una producción superior a los 3 millones de toneladas anuales (GVA, 2017).

Tanto gran parte de estos cultivos como, aproximadamente, unas 220.000 ha de frutales no cítricos, son susceptibles al ataque de *C. capitata* en España, sin tener en cuenta el posible efecto que pueda tener esta especie, en situaciones límite, sobre hortalizas, que ocupan otras 340.000 ha (MAPAMA, 2017b). Todo ello determina que *C. capitata* tenga una gran importancia tanto a nivel social como a nivel económico en nuestro país, importancia que ha ido en aumento debido al auge de variedades extratempranas de cítricos cuya maduración y, por tanto, mayor susceptibilidad coincide con los picos poblacionales del insecto (Martínez-Ferrer *et al.*, 2007).

Según Moner *et al.* (1988), los daños causados por la mosca pueden ser tanto directos (sobre el fruto) como indirectos:

- Directos: el desarrollo de las larvas en el interior de los frutos conlleva, por un lado, la realización de un orificio en la superficie de dicho fruto; por otro, la construcción de galerías internas por las cuales avanza la larva en sus distintas fases; y, finalmente, la formación de otro orificio por el que la larva L3 salta al exterior. De este modo, se crea una vía de entrada para hongos y bacterias que descomponen la pulpa, acelerando la caída del fruto. Además, la picadura inicial desencadena una reacción necrótica a su alrededor que resulta visible y deprecia el valor del fruto.

- Indirectos: se consideran daños indirectos las pérdidas económicas debidas a la disminución de producción, depreciación del fruto o merma en destino al envasar frutos atacados por la mosca. A todo ello hay que añadir las pérdidas económicas sufridas en los países con presencia de plaga debido a la aplicación de protocolos de cuarentena en zonas libres de *C. capitata*, que limitan la exportación de los frutos (Enkerlin, 2005).

1.2.6. Métodos de control

La mayoría de los diferentes métodos considerados para el control de *C. capitata* van dirigidos hacia su fase adulta. Este tefrítido es una especie de hábitos endófitos, ya que las larvas viven y se alimentan en el interior del fruto, y la pupación tiene lugar bajo tierra al enterrarse la larva L3 que ha saltado previamente al suelo. Esto hace que la fase adulta de la mosca sea la más expuesta o vulnerable, y por lo tanto la más susceptible de sufrir la acción humana.

A la hora de definir las estrategias de control contra esta plaga, hay que tener en cuenta las siguientes características de la mosca (Llorens, 2002):

- Las larvas se alimentan a partir de las frutas, causando daños considerables en la cosecha.
- Huevos, larvas y pupas son fases protegidas; las dos primeras, en el interior del fruto, y la última bajo tierra.
- El adulto es de vida solitaria (aunque tiende a formar pequeñas agregaciones durante el cortejo a la hembra).
- Es una especie con gran capacidad de dispersión hacia nuevas áreas libres de plaga; hay evidencias de que los adultos pueden volar hasta 20 km de distancia (Fletcher, 1989).
- *C. capitata* muestra una muy buena adaptación a las condiciones climáticas, pudiendo adaptar la duración de su ciclo en función de la temperatura (en relación inversa).

De entre los métodos de control para *C. capitata* que se describen a continuación, se deben seleccionar y combinar aquellos que resulten idóneos para el tratamiento de la plaga en función de las circunstancias, buscando un manejo eficaz y a la vez respetuoso con el medio ambiente.

1.2.6.1. Métodos culturales

Son los más utilizados en el control de *C. capitata* desde el punto de vista tradicional. Comprenden el manejo del cultivo; en este sentido, las prácticas más comunes son dos: por un lado, la recolección y enterrado de la fruta caída o madura aún en árbol que no se vaya a comercializar, lo cual evita el desarrollo de larvas en su interior y limita la cantidad de frutos hospedantes (Chueca, 2007); y, por otro lado, la eliminación de plantas hospedadoras que puedan servir a la plaga como reservorios (Castañera, 2003), especialmente en aquellas zonas próximas a las parcelas comerciales.

1.2.6.2. Métodos físicos

Métodos basados en la respuesta o tolerancia que pueda presentar la mosca frente a determinados parámetros físicos (luz, temperatura, humedad, concentración de gases...). Normalmente la fase que se expone a estos parámetros es la fase larvaria. Los métodos físicos más comúnmente utilizados son las atmósferas letales de CO₂ y los tratamientos térmicos por choque frío-calor durante el almacenamiento cuarentenario (Garzón-Luque, 2007).

1.2.6.3. Control químico

Consiste en el empleo de sustancias químicas de naturaleza insecticida (ver apartado 1.1.3.1), frecuentemente mezcladas con algún tipo de atrayente alimenticio, que suele ser proteína natural hidrolizada.

El uso de estos químicos contra la mosca mediterránea de la fruta ha ido cambiando a lo largo de los años: en los años '40 el insecticida más utilizado era un organoclorado como el DDT, que fue sustituido progresivamente por organofosforados como el Fention® o el Malation®; éste último se ha empleado hasta hace bien poco, normalmente mezclado con proteína hidrolizada y a través de aplicaciones terrestres y pulverizaciones aéreas de ultra-bajo volumen con avionetas. Dichas avionetas, en las épocas más recientes, estaban provistas de un GPS que evitaba la aplicación en zonas habitadas o con parcelas ecológicas. Sin embargo, tanto la aplicación aérea como terrestre del Malation® no ha demostrado capacidad para mantener la plaga por debajo del umbral económico de daño; y los efectos nocivos de este producto sobre la salud humana (Flessel *et al.*, 1993), el medio ambiente (Mañosa *et al.*, 2001) y la fauna útil (Urbaneja *et al.*, 2009), además de la aparición de poblaciones de la plaga resistentes a él (Ortego *et al.*, 2005), han llevado a su prohibición desde el año 2009.

La tendencia actual es la reducción del control químico en la medida de lo posible, empleándolo únicamente en aquellos casos en que los daños no se pueden evitar por métodos alternativos. En el caso de que se recurra al control químico, lo ideal es incluirlo en el manejo

integrado de la plaga (ver apartado 1.1.3.2), es decir, emplear productos que sean compatibles con otras actividades de control y que tengan un mínimo impacto en la naturaleza. Actualmente, algunos de los productos más selectivos (dentro de los registrados para el control químico de *C. capitata* en España) para los enemigos naturales (parasitoides y depredadores) de la plaga en aquellas zonas con programas GIP contra *C. capitata* son el Spinosad, Fosmet y λ -cialotrina (Williams *et al.*, 2003; Urbaneja *et al.*, 2009), si bien no logran ser selectivos al 100% y, además, también empiezan a desarrollar resistencia en las poblaciones de campo (Couso-Ferrer *et al.*, 2011). El desarrollo de productos cada vez más selectivos combinados con atrayentes más potentes y con mayor durabilidad en campo, debería permitir la reducción de las aplicaciones sin tener que sacrificar los niveles de control requeridos para lograr la erradicación de esta especie plaga (Montoya *et al.*, 2010).

1.2.6.4. Control técnico o semioquímico

Esta técnica de control consiste en el empleo de semioquímicos (compuestos orgánicos volátiles implicados en la interacción entre organismos) como atrayentes para la mosca hacia una trampa o sistema de captura. Dichos semioquímicos pueden ser alimenticios o de atracción sexual, y en los procesos de control pueden emplearse semioquímicos naturales o de síntesis (Primo Yúfera, 1991). En la trampa, la mosca resulta muerta por acción de un insecticida. La eficacia del sistema de trampeo va a depender del trinomio “tipo de atrayente -tipo de trampa -tipo de insecticida”; otros factores que influirán en la efectividad de este sistema son el tipo de cultivo donde se instauren las trampas; las condiciones climáticas; o el nivel poblacional que muestre la plaga en cada momento (Peñarrubia-María, 2010).

Actualmente, en España y más concretamente en la Comunidad Valenciana (zona más afectada por la acción de *C. capitata*), se utilizan dos tipos de sistemas de trampeo, incluidos en el “Plan Integral de Actuación contra la Mosca Mediterránea de la Fruta”:

- Trampeo de seguimiento: para realizar el seguimiento de las poblaciones de *C. capitata* se utilizan las trampas del tipo Nadel®, en las cuales se introduce una paraferomona sexual atrayente de machos (a base de Trimedlure®), y una pastilla de insecticida (tradicionalmente a base de Diclorvos®, conocida como vapon). Los conteos realizados a través de este método aportan información sobre la evolución de las poblaciones de machos de mosca durante un cierto periodo de tiempo. Normalmente se suele utilizar una de estas trampas cada 200 hectáreas de terreno (GVA, 2016).
- Trampeo masivo: para controlar focos de mosca en frutales aislados se realiza la captura masiva de adultos de *C. capitata*; con este fin se utilizan trampas del tipo Tephritrap®, cebadas con una mezcla de tres atrayentes alimenticios sintéticos (trimetilamina,

putrescina y acetato amónico), junto con una pastilla de vapona que causa la muerte a aquellas moscas que penetran en la trampa (Primo Yúfera, 1991). Este sistema atrae especialmente a las hembras, y dentro de los machos atraídos se ha visto una predominancia de machos estériles respecto a los salvajes (Midgarden *et al.*, 2004). En los últimos años también se han utilizado trampas sin insecticida (debido a las restricciones del uso de la vapona), siendo en este caso provocada la muerte por ahogamiento, al emplearse trampas líquidas del tipo Ceratrap®. La densidad a la que se deben colocar estas trampas es de aproximadamente unas 50 por hectárea (GVA, 2016). Una variedad de este sistema es el trampeo “por atracción y muerte”, en el que las moscas no quedan atrapadas y, por ello, las trampas no se saturan, resultando más barato el recambio y mantenimiento de éstas (Navarro-Llopis, 2009; Navarro-Llopis *et al.*, 2013, 2015; Hafsi *et al.*, 2015).

Hay muchos tipos y diseños de trampas, que varían mayoritariamente en el tipo de material utilizado (cristal o plástico), los colores utilizados (ya que se ha demostrado que también existen factores de atracción a distintos colores) y el tamaño y disposición de las aperturas que sirven como vía de entrada para las moscas. En cuanto a las sustancias insecticidas empleadas, a excepción de en las trampas de atracción y muerte (donde se usa un piretroide), tradicionalmente se ha empleado Diclorvos® (DDVP o vapona), cuyo uso está prohibido desde el año 2012 tras su propuesta de retirada por la Directiva Europea 91/414 EEC (CEE, 1991); sin embargo, dada su alta efectividad en campo y hasta que se encuentre una alternativa efectiva, su empleo (sólo para trampas para *C. capitata*) sigue permitiéndose por parte del MAPAMA a través de autorizaciones anuales de venta limitada.

En definitiva, el empleo de semioquímicos y el trampeo masivo en particular constituyen una alternativa que minimiza los efectos nocivos sobre medio ambiente, enemigos naturales y frutos (Lux *et al.*, 2003; Leblanc *et al.*, 2010).

1.2.6.5. Lucha autocida o técnica del insecto estéril (TIE)

La técnica del insecto estéril (TIE) o control autocida es un método de control consistente en la liberación sistemática de un número elevado de insectos plaga esterilizados (generalmente machos) con el fin de reducir la progenie o siguiente generación de la especie diana. Es un método de control de la natalidad, ya que los machos esterilizados producen espermatozoides con una alta carga mutacional que no dan lugar a individuos adultos (Argilés y Tejedo, 2007).

El objetivo final de la TIE es la reducción poblacional de dicha especie plaga, con el fin de mantener sus poblaciones por debajo del umbral económico de daño. Se trata de una técnica

muy respetuosa con medio ambiente y salud humana, sin efecto nocivo alguno sobre cultivos y frutos y que permite reducir la aplicación de productos químicos en las zonas de presencia de la plaga (Juan-Blasco, 2012).

Para que la aplicación de la TIE sea eficaz, se deben cumplir una serie de requisitos (Lance y McInnis, 2005):

- Debe llevarse a cabo una cría en masa, una esterilización y una suelta en masa lo suficientemente grande como para que el ratio “adultos estériles/adultos fértiles” de la zona tratada sea lo suficientemente elevado.
- Los machos estériles deben ser capaces de competir de manera eficaz en campo con los ejemplares salvajes.
- Los machos estériles deben poder distinguirse de los salvajes con el fin de realizar el seguimiento de sus liberaciones.
- Los machos estériles deben producir un 100% de progenie no viable.

La TIE es uno de los principales métodos en que se basa el “Plan Integral de Actuación Contra la Mosca Mediterránea de la Fruta” en la Comunidad Valenciana, empleándose, en concreto, cuando los niveles de la población son bajos, ya que se considera más efectivo en estos casos. Por ello, esta técnica normalmente se combina con otros métodos de control con los que no ha mostrado incompatibilidades hasta la fecha (Argilés y Tejedo, 2007; Navarro-Llopis *et al.*, 2011).

Así, entre los años 2002 y 2006, la Generalitat Valenciana gestionó, a través de la empresa TRAGSA, la suelta de machos estériles en programas piloto empleando pupas estériles de *C. capitata* procedentes de la Bioplanta de Mendoza (Argentina) (Argilés y Tejedo, 2007). Ya en 2007 se inició la producción de machos estériles en la biofábrica construida en Caudete de las Fuentes (Valencia) y gestionada también por TRAGSA, la cual posee una capacidad máxima de producción de 540 millones de pupas de machos estériles a la semana, permitiendo la aplicación de este método sobre unas 152.000 ha de terreno (Argilés y Tejedo, 2007; Juan-Blasco, 2012; GVA, 2016).

1.2.6.6. Control biológico

El control biológico se define como “el uso de organismos vivos para suprimir la densidad de población o el impacto de un organismo plaga específico, haciendo que se haga menos abundante y menos perjudicial de lo que podría llegar a ser sin la actuación de aquellos” (Eilenberg *et al.*, 2001). Como ya se ha citado en el apartado 1.1.3.2, se trata de un método que

resulta altamente respetuoso con el medio ambiente y que, llevado a cabo de la forma adecuada, carece de efectos perjudiciales (Van Driesche y Bellows, 1996), lo que provoca que, actualmente, esté muy en boga no sólo frente a *C. capitata*, sino en el control de plagas agrícolas en general.

Hoy día podríamos definir tres tipos de control biológico en función de cómo se utilizan los agentes de control: control biológico por conservación control biológico clásico y control biológico por aumento.

- El control biológico por conservación se define como la “modificación del ambiente a través de prácticas agrícolas, con el fin de optimizar la actuación de enemigos naturales específicos y así reducir el efecto de las plagas” (Hajek, 2004). El empleo de este tipo de control ha sido defendido por algunos autores como Aluja (1999), quien enfatizó el papel que podrían desempeñar ciertas formas vegetales (arbustos, árboles) como reservorios para el mantenimiento de parasitoides y otros enemigos naturales. El éxito de este tipo de control biológico requiere, eso sí, de una planificación inicial, definiéndose ante todo los mecanismos potenciales en los que se basaría la acción de los enemigos naturales, mecanismos que deben traducirse en propuestas concretas para el manejo del hábitat (Aluja y Birke, 1993).
- El control biológico clásico, por su parte, consiste en la “liberación de enemigos naturales cuyo origen corresponde al de la plaga que se quiere controlar y que fue introducida en una determinada región a modo de plaga exótica” (De Bach, 1974). Se trata, pues, de un método de control basado en una importación inicial de una especie de enemigo natural y su posterior liberación en ese nuevo territorio con el fin de controlar la plaga. Lamentablemente, este tipo de control no suele ser muy efectivo para moscas de las frutas, debido a que los requerimientos ambientales de la especie exótica beneficiosa no suelen coincidir con los existentes en la zona de destino. Así pues, lo normal es que la especie importada no pueda perpetuarse ni, consecuentemente, establecer el control deseado. Además, el control se ve limitado por la tasa de incremento poblacional de estas especies exóticas (Montoya, 1999).
- Finalmente, el control biológico por aumento se basa en la liberación continuada de enemigos naturales, de forma inoculativa o inundativa, hasta que se produzca el control de la plaga. Para ello ha de establecerse un sistema de cría masiva que permita liberar de forma continuada al enemigo natural en toda el área de ataque de la plaga. Así, hoy en día prácticamente todos los programas de control de moscas de las frutas incluyen un programa de producción y liberación masiva de parasitoides, haciendo necesarios los

estudios de viabilidad y adaptación a cría masiva de las especies importadas en cada caso (Montoya, 1999).

En cuanto a los agentes de control biológico, para *C. capitata* en concreto podríamos citar también tres tipos: agentes entomopatógenos (bacterias, virus, hongos y nematodos microscópicos) (responsables de la lucha microbiológica); artrópodos depredadores y artrópodos parasitoides (responsables de la lucha biológica).

- Agentes entomopatógenos: En cuanto a las bacterias se refiere, la más estudiada es *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner 1915. Es una bacteria capaz de producir diversas toxinas, siendo las más utilizadas para el control de plagas agrícolas la δ -endotoxina y la β -exotoxina, que son específicas de cada cepa de Bt y tienen organismos diana distintos. Las toxinas de esta bacteria actúan por contacto, y el efecto que producen en *C. capitata* es un retardo o inhibición de la pupación (Vidal-Quist *et al.*, 2010; Aboussaid *et al.*, 2011). También pueden tener una acción crónica, o afectar la aptitud del adulto procedente de larvas tratadas (Montoya *et al.*, 2010). Además, esta y otras bacterias pueden tener efectos secundarios sobre la reproducción y transmitirse sexualmente de manera horizontal (Castillo *et al.*, 2000; Dimbi *et al.*, 2003; Quesada-Moraga *et al.*, 2006). Eso sí, hasta la fecha no se ha identificado ninguna cepa que sea 100% eficaz contra *C. capitata*.

Por su parte, los virus han sido poco estudiados para el control de moscas de la fruta. Sí se ha identificado un virus de la familia Reoviridae que es capaz de replicarse y matar adultos de *C. capitata* (Plus y Cavalloro, 1983) y otro que presenta un gran potencial contra la mosca del olivo (Manousis y Moore, 1989), pero ninguno de ellos parece tener potencial suficiente como para causar mermas importantes de la plaga en condiciones de campo.

De entre los hongos que afectan a *C. capitata*, destacan dos especies: *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 y *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, ambos pertenecientes a la clase de los *Hyphomycetes*. Son organismos fúngicos que atacan a diversas especies de insectos de vida total o parcialmente edáfica. Pueden infectar el tegumento del hospedador, aunque también pueden actuar cuando son ingeridos por el tracto digestivo e incluso penetrar a través de heridas (Montoya *et al.*, 2010). Actualmente se están probando metabolitos secundarios producidos por estos dos ascomicetos como alternativa a su uso in vivo, por los requerimientos de temperatura y humedad que tienen (Lozano-Tovar *et al.*, 2015).

Respecto a los nematodos microscópicos, éstos son habitantes naturales del suelo, donde pueden parasitar una gran variedad de hospedadores. El parasitismo que ejercen sobre moscas de las frutas tiene lugar cuando éstas están en fase de larva L3 (inicial y tardía); la infección en adultos es muy baja, y en pupa, inexistente. A través de diversos ensayos de laboratorio y evaluaciones en campo, ha podido probarse la efectividad de estos microorganismos, efectividad que depende de factores tales como la temperatura ambiente, la textura y humedad del suelo, y la profundidad a la que se localiza el hospedador (Toledo *et al.*, 1999; Gazit *et al.*, 2000).

- Artrópodos depredadores: Los depredadores naturales de *C. capitata* suelen ser especies polífagas de suelos de cultivo (Castañera, 2007); es decir, las fases de la mosca más susceptibles a la depredación son la L3, la pupa, y el imago recién emergido (antes de desplegar las alas al completo y tener capacidad de vuelo). Dentro de los depredadores hoy día conocidos podríamos destacar algunos miembros de la familia Formicidae, como *Iridomyrmex humilis* (Mayr, 1968), hormiga depredadora de larvas de último estadio y pupas; *Solenopsis geminata* (Fabricius, 1804), también depredadora de larvas y pupas; y *Pheidole pallidula* (Nylander, 1849), voraz depredadora de larvas (Wong *et al.*, 1984; Eskafi y Colbe, 1990; Urbaneja *et al.*, 2006). Dentro del orden Araneae (arañas *sensu stricto*) cabría citar especies tales como *Cheiracanthium mildei* (L. Koch, 1864), de la familia Eutichuridae, que siente atracción por el olor que desprenden los machos de la mosca; o el licósido *Pardosa cribata* Simon, 1876, buen depredador de larvas y pupas (Monzó *et al.*, 2010). Otros depredadores polífagos que pueden atacar a *C. capitata* se enmarcan en el orden Coleoptera, como por ejemplo el carábido *Pseudoophonus rufipes* (De Geer, 1774), que ataca desde larvas L3 a adultos recién emergidos del pupario (Monzó *et al.*, 2005, 2011). Además, varias avispas solitarias del género *Crabro* Fabricius, 1775 cazan moscas juveniles al vuelo y las llevan hasta sus nidos para alimentar a sus crías (Urbaneja *et al.*, 2005).
- Artrópodos parasitoides: los parasitoides son insectos cuyas larvas se alimentan a partir del cuerpo de otros artrópodos, normalmente insectos, resultando dicha alimentación larvaria en la muerte del hospedador (Godfray, 1994). Hoy día se considera que hasta un 25% de las especies de insectos podrían ser parasitoides, perteneciendo la mayoría de éstos a los órdenes Hymenoptera y Diptera (Mills, 2009). En este sentido, a fecha de hoy hay ya descritas aproximadamente unas 5000 especies de himenópteros parasitoides, unas 1500 especies de dípteros parasitoides (pertenecientes, sobre todo, a las familias Tachinidae y Bombyliidae) y unas 3000 especies de parasitoides pertenecientes a otros órdenes, como Coleoptera, Lepidoptera y Neuroptera (Godfray, 1994).

En cuanto al control de *C. capitata* mediante el uso de parasitoides se refiere, desde el siglo pasado y hasta la actualidad han sido varios los programas desarrollados en este sentido tanto a nivel mundial como a nivel nacional. Actualmente se considera que, si bien la acción de estos parasitoides no es suficiente por sí sola para controlar los daños producidos por la mosca, sí que puede tener un papel importante a la hora de reducir los niveles poblacionales de ésta en campo (Urbaneja *et al.*, 2012).

En el siguiente apartado se resume la historia, la situación actual y las perspectivas de futuro de este tipo de lucha biológica contra *C. capitata*, al ser uno de los principales temas sobre los que gira este trabajo de tesis.

1.3. CONTROL BIOLÓGICO DE *Ceratitis capitata* POR MEDIO DE PARASITOIDES



Figura 1.10. Hembra adulta del braconido *Diachasmimorpha tryoni*. Fotografía: Francisco Beitia.

A nivel mundial, los primeros intentos de lucha biológica mediante el uso de parasitoides contra esta plaga datan de principios del siglo XX, más concretamente del año 1902, y se localizan en la parte Occidental de Australia, donde se habría introducido poco antes *C. capitata*.

Una de las zonas claves en este tipo de lucha contra esta mosca de la fruta sería el archipiélago de las Hawaii, donde en el año 1910 se descubre la presencia de *C. capitata*, ya considerada un año después como seria plaga de diversos cultivos de las islas. Ante este hecho, ya en 1912 se importan desde esta zona diversas especies de himenópteros parasitoides de todo el mundo, entre ellos *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) (**Fig. 1.10**) que en 1914 se consideraría establecida en Hawaii (Back y Pemberton, 1918; Cánovas, 1940; Headrick y Goeden, 1996). A lo largo del siglo pasado continuaron introduciéndose otras especies de parasitoides en Hawaii, pero, en vista del escaso funcionamiento de estos mecanismos de control biológico clásico, en las últimas décadas se ha optado por un cambio de estrategia; así, desde los años '70, a nivel mundial se ha apostado por el control biológico por aumento, llevándose a cabo la cría masiva de aquellas especies que mayor eficacia de parasitismo tienen y mejor actúan en condiciones de campo. Así se consigue su incremento poblacional en laboratorio para su posterior suelta masiva. De este modo, en los últimos años se han desarrollado programas de control biológico de la mosca mediterránea mediante parasitoides en Centroamérica y Sudamérica (Bautista *et al.*, 1999) empleando ese control por aumento. Al principio, los principales trabajos se centraron en



Figura 1.11. Hembra adulta del braconido *Diachasmimorpha longicaudata*. Fotografía: Fernando Ferrara.

la utilización de parasitoides de huevos del género *Fopius* Wharton, 1987 (Hymenoptera: Braconidae), como *F. arisanus* (Sonan, 1932), *F. ceratitivorus* Wharton, 1999 y *F. caudatus* (Szèpligeti, 1913); sin embargo, en la época más reciente se ha potenciado el trabajo con algunas especies de endoparasitoides larvarios como es el caso de los también braconidos *D. tryoni* (ya citado anteriormente) y, sobre todo, *D. longicaudata* (Ashmead, 1905) (**Fig. 1.11**) (Harris *et al.*, 2000; Sivinski *et al.*, 2000; Paranhos *et al.*, 2007).

En el caso concreto de España, a principios de siglo XX intentó seguirse el modelo de Hawaii, y para ello se procedió también a la importación de parasitoides exóticos para ser probados contra la plaga. Así, entre los años 1932 y 1933, en la Estación Fitopatológica de Burjassot (Valencia) se recibieron ejemplares de dos especies de braconidos: *Opius humilis* (Silvestri, 1913) y *D. tryoni*, con el fin de multiplicarlos en laboratorio y proceder a su suelta en campo (Gómez-Clemente, 1932, 1934). Sin embargo, el proceso no fue ni mucho menos exitoso, ya que a la alta mortalidad de individuos en el transporte desde Hawaii se unirían una serie de errores en el sistema de cría, cría que acabaría por extinguirse (Gómez-Clemente, 1932, 1934). Desde este momento y hasta principios del siglo XXI, la lucha biológica en general y contra *C. capitata* en particular quedaría relegada a un segundo plano en nuestro país, muy por detrás del control químico (Beitia *et al.*, 2002). Así, los intentos de lucha biológica con parasitoides durante estas décadas en España se reducirían a algunas importaciones de escasa relevancia, como la del himenóptero eulófidio *Tetrastichus giffardianus* Silvestri, 1915 en los años '60 en Canarias (Moner *et al.*, 1988), o la del braconido *Opius concolor* Szèpligeti, 1910 en los '70, que tenía por fin controlar simultáneamente las plagas de dos tefrítidos: la mosca del olivo *Bactrocera oleae* y la mosca mediterránea de la fruta (Domínguez García-Tejero, 1989). Todos estos intentos resultaron, finalmente, infructuosos.

La situación del control biológico en España y, más concretamente, de la lucha biológica mediante parasitoides contra *C. capitata*, cambia radicalmente en el año 2002, cuando se da por iniciado el “Plan Integral de Actuación Contra la Mosca Mediterránea de la Fruta” (ya citado en los apartados 1.2.6.4 y 1.2.6.5) por parte de la Generalitat Valenciana. Este plan se enmarca dentro de una estrategia GIP (Gestión Integrada de Plagas; ver apartado 1.1.3.2) contra *C. capitata* conforme la legislación europea, y aborda el empleo de gran parte de los métodos de control citados anteriormente, como la aplicación racional de fitosanitarios, sistemas de trampeo, lucha autocida y, por supuesto, el control biológico (Sabater-Muñoz *et al.*, 2012).

En lo que al control biológico respecta, en este Plan se proponen dos vías principales de actuación: por un lado, se considera la importación de parasitoides exóticos para su aclimatación y liberación en campo, perfeccionando las introducciones que ya se habían intentado antaño; por otro lado, se plantea la búsqueda de parasitoides autóctonos de la mosca que puedan estar presentes de manera natural en el ecosistema citrícola de la Comunidad Valenciana y cuya permanencia en el mismo sea más fácil (Sabater-Muñoz *et al.*, 2012; Beitia *et al.*, 2014). Así, respecto a los parasitoides exóticos, en el año 2002 se importaron desde el USDA-ARS de Hawaii dos especies de braconidos ya mencionados anteriormente: *Fopius arisanus* y *Diachasmimorpha tryoni*, parasitoides de huevos y larvas respectivamente; y, en 2008, desde la Planta de Cría y Esterilización de Mosca de la Fruta y Parasitoides (Moscafrut) en Metapa de Domínguez (México), se importaron ejemplares de *D. longicaudata*, braconido que actúa como parasitoide larvo-pupal y que, actualmente, es el más empleado a nivel mundial como agente de control biológico contra *C. capitata* (Benavent, 2010). En el caso de los dos primeros parasitoides, y pese a que los primeros estudios y ensayos en campo demostraron niveles de parasitismo considerables, ambas especies parecen no aclimatarse a las condiciones climáticas de la región mediterránea (Beitia *et al.*, 2002, 2006; Falcó *et al.*, 2003; Pérez-Hinarejos *et al.*, 2006; Santiago *et al.*, 2006). Por su parte, *D. longicaudata* parece haber demostrado mayor eficacia en laboratorio que las actuales, y su evaluación sigue en curso hoy en día (Beitia *et al.*, 2011; Harbi *et al.*, 2015a,b).

En cuanto a la búsqueda de parasitoides autóctonos, ya en el período 2002-2003 se encontraron en la Comunidad Valenciana dos especies de parasitoides que atacan al estado pupal de *C. capitata*: los pteromálicos *Spalangia cameroni* Perkins, 1910 y *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875) (Beitia *et al.*, 2006). De estas dos especies, la segunda puede actuar de hiperparasitoide, mientras que la primera, *S. cameroni*, es un parasitoide que se puede criar de forma masiva sobre pupas muertas de *C. capitata*, lo que facilita enormemente su producción (Beitia *et al.*, 2010). La cría masiva de *S. cameroni* está todavía en fase de estudio, por lo que su aplicación en un programa aumentativo sigue pendiente (Tormos *et al.*, 2010). Más reciente es la identificación en la Comunidad Valenciana de otra especie de parasitoide, el himenóptero figítido *Aganaspis daci* (ver a continuación, apartado 1.4), que se capturó en el año 2009 parasitando a *C. capitata* en frutos de higuera durante un ensayo de campo que se estaba realizando con *D. longicaudata* (Verdú *et al.*, 2011). Esta captura constituiría su primera cita en España, y una de las primeras en todo el continente europeo.

1.4. *Aganaspis daci* (WELD) (HYMENOPTERA: FIGITIDAE)

1.4.1. Situación taxonómica

Aganaspis daci (Weld, 1951), según Wharton y Yoder (2017), se encuadra en los siguientes taxones de hexápodos:

Subclase INSECTA

Orden HYMENOPTERA

Suborden APOCRITA (Serie Parasítica)

Familia FIGITIDAE

Subfamilia EUCOILINAE

Género *Aganaspis* Lin, 1987

Especie *Aganaspis daci* (Weld, 1951)

1.4.2. Morfología y biología

El adulto de *A. daci* se caracteriza por ser un pequeño himenóptero, de cuerpo negro y con mandíbulas, patas y abdomen ventral rojizos. Su cabeza es ligeramente cúbica, prácticamente lampiña, y sus ojos son pilosos. Las alas son ligeramente ahumadas, setosas, y marginalmente ciliadas, con venas parduzcas, con la celda radial (marginal) abierta y 2.3 veces más larga que ancha. El tórax es ligeramente robusto, y el abdomen está comprimido lateralmente, por lo que es más largo que ancho.



Figura 1.12. Macho (derecha) y hembra (izquierda) adultos de *Aganaspis daci*. En rojo, ovipositor de la hembra. Apréciese también la diferente longitud de antenas entre ambos ejemplares. Fotografía: Luis de Pedro.

El dimorfismo sexual es claramente apreciable en esta especie (**Fig. 1.12**) debido a que las hembras presentan antenas moniliformes constituidas por 13 antenómeros, mientras que en los machos las antenas son típicamente filiformes, más largas y constituidas por 15 antenómeros (Weld, 1951).

En cuanto a su biología se refiere, *A. daci* es un endoparásitoide solitario, koinobionte (= cenobionte, es decir, sus hembras adultas no matan ni paralizan completamente al hospedador al inyectarle el ovipositor, sino que son sus larvas las que progresivamente se van alimentando de dicho hospedador hasta causarle la muerte) y larvo-pupal de dípteros tefrítidos que deposita sus huevos en el último estado larvario de éstos últimos.

1.4.3. Origen, distribución y uso como agente de control biológico

Aganaspis daci es una especie originaria del sudeste asiático, que fue identificada por primera vez en Malasia parasitando tefrítidos del género *Dacus* Fabricius, 1805 (concretamente de la especie *Dacus dorsalis*, actualmente *Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912)). Poco después de su descubrimiento, nuevos ejemplares serían recuperados de puparios de *Dacus* en zonas tales como Borneo o Australia (Clausen *et al.*, 1965; Wharton y Yoder, 2017).

Se trata de una de las cuatro especies del género *Aganaspis* Lin, 1987 que parasitan dípteros tefrítidos; las otras tres (*Aganaspis alujai* Wharton y Ovruski, 2007, *A. nordlanderi* Wharton, 1998 y *A. pelleranoi* (Brèthes, 1924)), a diferencia de *A. daci* que es asiática, son de origen americano (neárticas y neotropicales). De las cuatro especies, sólo de dos, *A. daci* y *A. pelleranoi*, se tienen datos de su biología o se han utilizado en proyectos de control biológico (Clausen *et al.*, 1965; Núñez-Bueno, 1982; Ovruski, 1994; Ovruski y Aluja, 2002; Guimaraes y Zucchi, 2004; Gonçalves *et al.*, 2013).

Aganaspis pelleranoi fue criado en masa y liberado de forma cuantitativa entre los años 1941 y 1945 en diversas áreas de la zona de Tucumán, Argentina (Nasca, 1973) y, de manera más reciente, esta especie ha sido incluida en un plan de producción masiva en Metapa de Dominguez, Chiapas, México (Ruiz *et al.*, 1996). Su área de distribución actual es muy amplia, habiéndose citado en gran parte de la mitad norte de Sudamérica, y en esta zona parece tratarse de un buen candidato para el control de diversos tefrítidos, especialmente del género *Anastrepha* Schiner, 1868 (Guimaraes *et al.*, 1999, 2000; Nunes *et al.*, 2012).

En cuanto a *A. daci*, después de determinarse su capacidad de acción sobre diversos tefrítidos del género *Dacus* en su zona de origen, sería introducida en Hawaii como agente potencial de control para *B. dorsalis* (Clausen *et al.*, 1965). Más tarde, se introduciría también en Florida, donde se establecería exitosamente sobre *Anastrepha suspensa* (Loew, 1862), aunque a bajos niveles poblacionales (Glenn y Baranowski, 1987; Baranowski *et al.*, 1993). También se harían sueltas en México (Jiménez-Jiménez, 1956), y Costa Rica (Wharton *et al.*, 1981) para el control biológico de diversas especies del mismo género, *Anastrepha*, pero, en este caso, su establecimiento en estos países resulta aún dudoso (Wharton *et al.*, 1998). Además, se sabe que ha sido introducida en Norte y Centro América (Clausen, 1978; Wharton *et al.*,

1981) aunque los resultados de dicha introducción son un tanto difusos. Más recientemente, en 2010, se ha citado también la introducción de esta especie en Egipto (El-Heneidy y Ramadan, 2010) con el fin de combatir a la mosca del melocotón *Bactrocera zonata* (Saunders, 1841), pero aún se desconoce si se ha producido su adaptación en este lugar. En cuanto a datos de laboratorio se refiere, se han estudiado diferentes aspectos básicos de su biología asociados con programas de control de *B. dorsalis* en Hawai (Clausen *et al.*, 1965), de *A. suspensa* en Florida (Núñez-Bueno, 1982) y de *B. zonata*, en Pakistán (Andleeb *et al.*, 2010).

En el continente europeo, si bien se sabe que *A. daci* se introdujo, crió y liberó en Francia en la década de los '70 del siglo pasado con el fin de controlar poblaciones de la mosca mediterránea de la fruta, no hay más datos acerca de su evolución y efectividad en campo (Núñez-Bueno, 1982). Recientemente ha sido citada su presencia en Grecia, concretamente en la isla de Chios (Papadopoulos y Katsoyannos, 2003), ubicada en el mar Egeo y próxima a la costa de Turquía; en este enclave se recuperaron ejemplares de *A. daci* a partir de puparios de *C. capitata* que estaba parasitando higos, mostrando este parasitoide una tasa de parasitismo muy elevada sobre la mosca mediterránea de la fruta, del orden del 45%. En este trabajo se indica que se trata de la primera cita sobre la recuperación de *A. daci* desde el campo en Europa, sin conocerse, eso sí, su posible origen en esta región geográfica. Finalmente, en los veranos de los años 2009 y 2010 se recuperaron ejemplares de parasitoides desde puparios de *C. capitata*, infestando higos y cítricos, en las localidades valencianas de Bétera y Sagunto, parasitoides que fueron identificados por análisis de atributos morfológicos como *A. daci* en lo que constituye la primera cita de esta especie en nuestro país y la segunda en todo el continente europeo (Martínez-Torres, 2011; Verdú *et al.*, 2011).

El reciente descubrimiento de *A. daci* en nuestro país, el gran desconocimiento existente actualmente acerca de esta especie, especialmente en nuestras latitudes, y los altos niveles de parasitismo que mostró, en el momento de ser descubierta, sobre un tefrítido plaga tan importante en la zona mediterránea como *C. capitata* motivaron que desde el IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias) se plantease iniciar su cría en laboratorio y la realización de diversos ensayos de campo y laboratorio para conocer más aspectos de su biología, ecología y acción parasitaria sobre la mosca mediterránea de la fruta. Con ello, se pretende evaluar a esta especie de parasitoide como posible agente en la lucha biológica contra esta plaga, lo cual constituye el principal objetivo de esta tesis doctoral.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. INSTALACIONES

La práctica totalidad de este trabajo de investigación se ha desarrollado en las instalaciones del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), situado en la localidad valenciana de Moncada (Carretera CV-315, Km 10.7 (Antigua Carretera Moncada-Náquera, Km. 4.5), C.P. 46113, Moncada, Valencia). En concreto, las instalaciones utilizadas durante este trabajo de tesis (realizado entre los años 2011 y 2015) son las siguientes:

2.1.1. Instalaciones de campo

Para la realización de los ensayos de campo, se dispuso de dos parcelas, de diferentes características:

- Parcela 1: parcela de 2 ha ($39^{\circ}35'17.7''\text{N}$; $0^{\circ}23'58.9''\text{W}$) de clementinos, con otros árboles aislados como nísperos o higueras, que fue utilizada para el seguimiento de poblaciones naturales del parasitoide *Aganaspis daci* (Weld) (**Fig. 2.1, 2.2**).
- Parcela 2: pequeña parcela de limoneros ($39^{\circ}35'12.7''\text{N}$; $0^{\circ}23'47.6''\text{W}$), empleada para valorar la actividad parasitaria en condiciones mediterráneas de dicha especie de parasitoide (**Fig. 2.1, 2.3**).

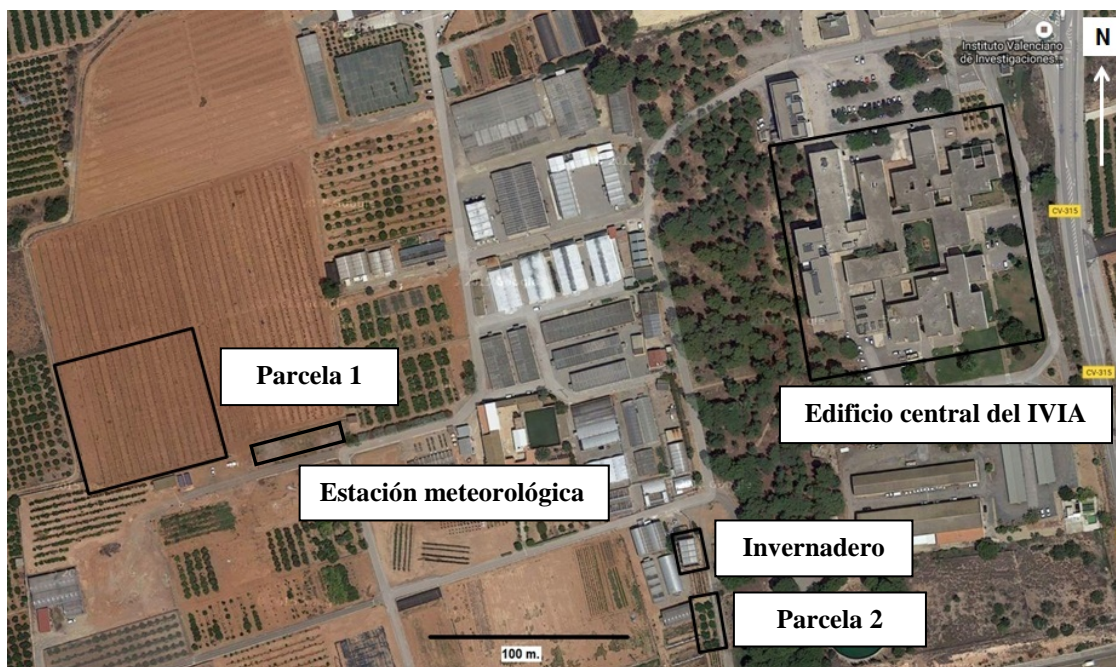


Figura 2.1. Vista aérea de las instalaciones del IVIA; remarcadas en recuadros negros se pueden apreciar aquellas que han sido utilizadas durante este trabajo de investigación, incluyendo las parcelas experimentales 1 y 2; la estación meteorológica; el invernadero y el edificio central del IVIA, donde se localizan todos los laboratorios utilizados.



Figura 2.2. Vista general de la parcela 1 con clementinos. Actualmente, como puede apreciarse en la vista aérea de la Figura 2.1, esta parcela se encuentra talada. Fotografía: Francisco Beitia.



Figura 2.3. Vista general de la parcela 2, poblada de limoneros. Fotografía: Francisco Beitia.

2.1.2. Instalaciones de semicampo


Los ensayos realizados en condiciones de semicampo se llevaron a cabo en un invernadero de cristal (**Fig. 2.1, 2.4**) muy próximo a la parcela 2 citada anteriormente ($39^{\circ}35'13.8''N$; $0^{\circ}23'48.0''W$). Dicho invernadero está equipado con 4 cabinas independientes para la cría y la realización de experimentos con artrópodos; en concreto, en este trabajo de tesis la cabina utilizada fue la número 3, equipada con 4 jaulones (125x120x70 cm) de tela de muselina con borde de plástico para la realización de ensayos en condiciones de aislamiento (**Fig. 2.4b**).



Figura 2.4. Invernadero de cristal puesto a disposición de la Unidad de Entomología del IVIA: **a)** Vista externa del invernadero; **b)** Jaulón con borde de plástico utilizado para la realización de ensayos en condiciones de aislamiento, y localizado en la cabina 3 del invernadero. Fotografías: Luis de Pedro.

2.1.3. Laboratorios

Durante la realización de este trabajo de investigación, se utilizaron los siguientes laboratorios:

- Laboratorio 1: este laboratorio dispone, entre su equipamiento, de un arcón congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el mantenimiento de la dieta artificial de *Ceratitis capitata* (Wiedemann); de varias cámaras climáticas SANYO MLR 350 (**Fig. 2.5**), para la realización de ensayos a temperaturas constantes; de un microscopio modelo Leica MZ12 de alta resolución con cámara acoplada para la obtención de fotos microscópicas; de una campana de extracción o vitrina de gases (Modelo “Nublar de pie”; Formimetal S.L.) para la realización de trabajos en condiciones de aislamiento; y de varias mesas de laboratorio donde se procesaron y se dejaron evolucionar diversos ensayos en condiciones de laboratorio.
- 
- Figura 2.5.** Cámara climática modelo SANYO MLR 350. Fotografía: Francisco Beitia.
- Laboratorio 2: de dimensiones mucho más reducidas que el anterior, este laboratorio se empleó principalmente para dejar evolucionar, en condiciones controladas, parte de los ensayos realizados. Dentro de su equipamiento, cabría destacar un microscopio Leica MZ9.5 de alta resolución, así como material necesario para la caracterización morfológica de fases.
 - Laboratorio 3 (**Fig. 2.6**): está dotado del siguiente equipamiento: un arcón congelador ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), empleado para matar insectos procedentes de crías y ensayos que no vayan a ser usados (**Fig. 2.6b**); mesas para la realización de ensayos; material fungible para la cría de insectos y la realización de ensayos; y dos cámaras climáticas (1 y 2) especialmente construidas por la empresa TRATAVENT S.L. (Valencia, España) para el IVIA, con las siguientes características:
 - Cámara 1 (**Fig. 2.7a**): Se trata de una cámara, dotada de un sistema propio de ventilación y humidificación, que incluye, en cada uno de sus lados, dos estantes a distintas alturas en los que se mantienen cajas de cría y ensayos con diferentes enemigos naturales. Dichos estantes, iluminados por un sistema de tubos fluorescentes, muestran una temperatura ligeramente diferente entre sí (la temperatura en el estante superior es de $27 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, en el inferior, de $24 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$);

si bien comparten el mismo fotoperíodo (16:8 (L:O)) y la misma humedad relativa ($65 \pm 10\%$),

En esta cámara se mantiene la cría de *C. capitata* (varias cajas de cría y las bandejas para la obtención de pupas que servirán como inicio de nuevas cajas de cría) y la cría del otro parasitoide larvario de *C. capitata* (además de *A. daci*) que actualmente se mantiene en el IVIA, el braconido *Diachasmimorpha longicaudata*, incluyendo sus cajas de cría, sus cajas de emergencia y las bandejas para la evolución de larvas de *C. capitata* que se usarán para mantener las crías de ambos parasitoides larvarios y realizar ensayos con ellos.

- Cámara 2 (**Fig. 2.7b, c**): Las condiciones y disposición de la cámara 2 son las mismas que las de la cámara 1, si bien en la cámara 2 se dispone, además, de un jaulón de malla de muselina con borde de metal de dimensiones 125x120x70 cm para la realización de ensayos en condiciones de aislamiento (**Fig. 2.7d**). En esta cámara se mantiene parte de la cría de *C. capitata* y cajas de cría y de emergencia de *A. daci*; además, en ella han tenido lugar gran parte de los ensayos en condiciones de laboratorio realizados con este parasitoide durante este trabajo de investigación.



Figura 2.6. Laboratorio 3: **a)** Visión general del laboratorio; **b)** Arcón congelador (-20 °C) utilizado para el depósito de posible material biológico contaminante. Fotografías: Francisco Beitia.



Figura 2.7. Cámaras climáticas 1 y 2: **a)** Vista interior de la cámara 1; **b)** Puerta de acceso a la cámara 2; **c)** Vista interior de la cámara 2; **d)** Detalle del jaulón con borde de metal disponible en la cámara 2. Fotografías: Luis de Pedro.

2.2. MATERIAL

El material utilizado de manera recurrente en este trabajo de investigación ha sido el siguiente:

2.2.1. Recipientes

2.2.1.1. Recipientes de cría

Para la cría de *C. capitata* (que, así como la de *A. daci*, será pormenorizada en el apartado 2.3) se emplean cajas de cría de metacrilato de 40x30x30 cm, con uno de sus laterales modificado en forma de ventana de tela de muselina; bajo cada una de estas cajas de cría, que están alzadas varios centímetros sobre el suelo gracias a listones de madera, se disponen dos barquetas de plástico (de medidas 30x7x5 cm y 15x7x5 cm), con agua, para la caída y la recogida de los huevos depositados por las hembras adultas (**Fig. 2.8**).

En cuanto a la cría del parasitoide *A. daci*, las cajas de cría consisten en recipientes de polipropileno de 35x30x35 cm, con caras laterales y superior modificadas en forma de ventanas

de tela de muselina, y con una cara posterior abierta en forma de manga (también de tela de muselina) que permite el cierre y la apertura de la caja al ser anudada y desanudada, respectivamente (**Fig. 2.9**); así puede manipularse el contenido de las cajas de cría y que, tras ello, éstas permanezcan cerradas evitando el escape de sus individuos. Además de las cajas de cría, en la cría de *A. daci* son importantes las cajas de emergencia, consistentes en recipientes de plástico de 20x15x10 cm con una ventana de muselina en la tapa superior para la aireación (**Fig. 2.10**).

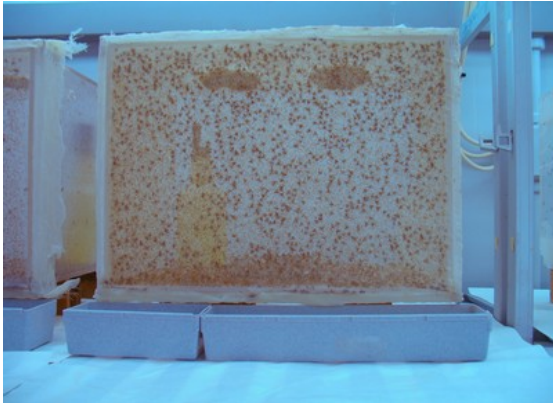


Figura 2.8. Vista general de una de las cajas de cría de *Ceratitits capitata*. La cara frontal de dicha caja está modificada en forma de ventana de tela de muselina. Bajo la caja, se aprecian dos barquetas de plástico, donde caerán los huevos que las hembras depositen en la tela. Fotografía: Luis de Pedro.



Figura 2.9. Vista general de un par de cajas de cría de *Aganaspis daci*. Se puede apreciar, en ellas, la ventana superior de tela de muselina (donde se han ofrecido larvas de *C. capitata*) y el cierre de la cara posterior a través de una manga de tela anudada (en amarillo). Fotografía: Luis de Pedro.



Figura 2.10. Caja de emergencia de *A. daci*. Puede apreciarse, en la cara superior, su ventana de tela de muselina para facilitar la aireación. Fotografía: Luis de Pedro.

2.2.1.2. Recipientes para ensayos

Se han utilizado diferentes recipientes, en función de que se tratara de evaluar la actividad del parasitoide (**Fig. 2.11**) o se tratara de obtener datos sobre la evolución de las pupas o larvas recogidas durante los ensayos (**Fig. 2.12**). Así, en el primer caso, se emplearon los siguientes:

- Recipientes de plástico (dimensiones: 20x15x10 cm), iguales que las cajas de emergencia de *A. daci* del apartado anterior, pero modificados con una cinta magnética alrededor de su ventana superior de muselina; son recipientes utilizados para valorar la actividad parasitaria de *A. daci*, por lo que la ventana superior se utiliza para el aporte de larvas de *C. capitata*. Éstas permanecerán confinadas gracias al acople sobre ellas de otra tela de muselina a través de la cinta magnética antes mencionada (**Fig. 2.11a**).
- Recipientes de plástico (dimensiones: 30x25x20 cm), con tapa superior modificada en forma de ventana de tela de muselina para la aireación (**Fig. 2.11b**). Estos recipientes se emplearon para la exposición de larvas en fruta en condiciones de laboratorio, pero también en ellos se dejaban evolucionar las bandejas con dieta artificial y huevos de mosca destinadas a la obtención de pupas para el inicio de nuevas cajas de cría de *C. capitata* y a la obtención de larvas para exponer a parasitoides.
- Cilindros de plástico de 15x20 cm, con pequeñas ventanas laterales de muselina para la aireación; estos recipientes fueron utilizados para valorar la longevidad de adultos de *A. daci* y para la oferta de larvas en fruta en condiciones de campo (**Fig. 2.11c**).
- Recipientes de plástico de 27x27x9 cm, empleados para la exposición de fruta cebo para la detección de *A. daci* en condiciones naturales (**Fig. 2.11d**).

En cuanto a los recipientes utilizados para permitir la evolución de las larvas/pupas recogidas en los ensayos (mayoritariamente en ensayos de actividad parasitaria), destacaríamos las placas Petri perforadas (con un par de ventanas redondeadas de tela de muselina; **Fig. 2.12**); y cajas de emergencia (**Fig. 2.10**) en cuyo fondo se disponía una capa de vermiculita.



Figura 2.11. Recipientes utilizados para la evaluación de la actividad del parasitoide *A. daci*: **a)** Caja de emergencia modificada para ensayos de actividad parasitaria. En la tapa (de color verde) se puede apreciar una ventana de tela rodeada de cinta magnética; **b)** Recipiente con ventana superior de muselina, usado para la evolución de huevos sembrados en dieta y para la oferta de fruta infestada en laboratorio; **c)** Cilindro de plástico, con ventanas laterales de tela, empleado en ensayos de longevidad y de acción parasitaria en campo; **d)** Recipiente usado para disponer fruta cebo en campo en el seguimiento de poblaciones naturales de *A. daci*. Fotografías: Luis de Pedro.



Figura 2.12. Placa Petri perforada para la evolución de larvas/pupas, mezcladas con dieta artificial, recogidas en ensayos de actividad parasitaria. Se puede apreciar, en su cara superior, un par de ventanas circulares de muselina (en amarillo) que facilitan la aireación y el secado de la dieta. Fotografía: Luis de Pedro.

2.2.2. Alimento

La alimentación de los insectos empleados en este trabajo de investigación incluía el aporte de agua y una dieta rica en carbohidratos, ya fuese en forma de azúcar, miel, o fruta (pequeñas porciones de manzana, variedad “Royal Gala”), ofrecidos de distinta forma en función del experimento. Además, la dieta de mosca se complementó con el uso de proteína hidrolizada (“Extracto de levadura para microbiología”, PanReac AppliChem).

2.2.3. Sustrato artificial

Para la simulación del suelo natural y, consecuentemente, para facilitar la pupación y el desarrollo de inmaduros del parasitoide, en algunos ensayos se utilizó un sustrato artificial. En concreto, el sustrato empleado fue la vermiculita, caracterizada por su pH neutro, por favorecer la aireación, y por su elevada ligereza y capacidad de absorción de agua.

2.2.4. Sistemas de medida de variables ambientales

En aquellos experimentos no realizados bajo condiciones ambientales controladas (por ejemplo, en los llevados a cabo en condiciones de campo o semicampo), la constatación de los datos ambientales bajo los que dichos ensayos se llevaron a cabo tuvo lugar mediante dos métodos:

- Por un lado, los datos de temperatura y de humedad relativa del aire se obtuvieron gracias a un DataLogger (modelo Delta-OHM HD226-1) que, depositado en el área en la que el experimento tuvo lugar, mostraba los valores que alcanzaban estas variables cada intervalo de una hora (**Fig. 2.13a**).
- Por otro lado, para experimentos exclusivamente de campo, aquellos datos ambientales no ofrecidos por el DataLogger (horas de sol, horas de frío, radiación, intensidad del viento, etc.) se obtuvieron a partir de la información que aportaba la estación meteorológica del IVIA (**Fig. 2.1, 2.13b**), localizada en el centro de sus instalaciones experimentales, muy próxima a la parcela 1 empleada en este trabajo de tesis (39°35'15.7"N; 0°23'56.5"W). Esta estación pertenece al modelo 2 de Estación Agroclimática del SIAR (Sistema de Información Agroclimática para el Regadío; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), y los datos obtenidos por la misma pueden consultarse en la página web <http://riegos.ivia.es>.

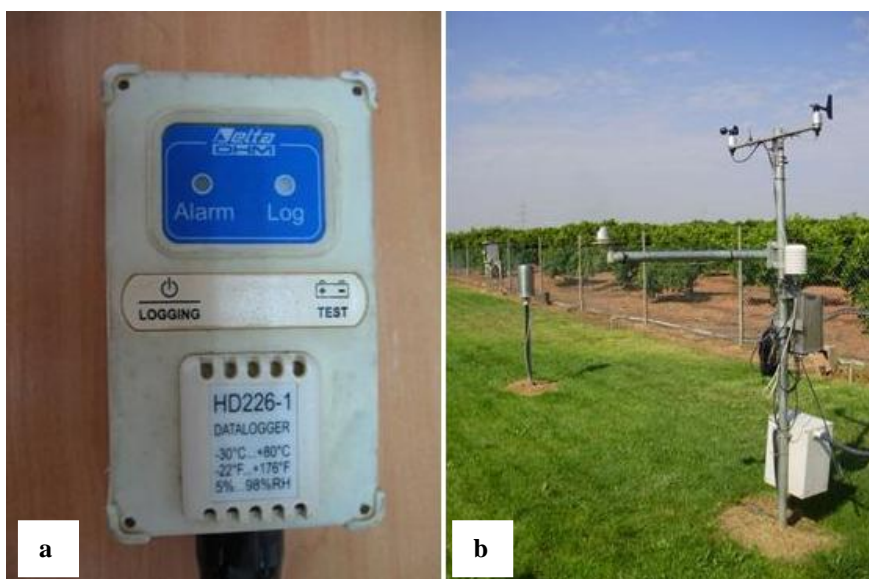


Figura 2.13. Sistemas de medida de variables ambientales usados durante este trabajo de tesis: **a)** DataLogger (modelo Delta-OHM HD226-1) empleado para la medición de temperatura y humedad relativa en diversos ensayos; **b)** Estación agroclimática del IVIA (<http://riegos.ivia.es>) en Moncada, localizada en sus instalaciones experimentales. Fotografías: a): Francisco Beitia. b): <http://riegos.ivia.es>.

2.3. SISTEMAS DE CRÍA ARTIFICIAL DE *Ceratitis capitata* Y

Aganaspis daci

La realización de ensayos de campo y laboratorio para valorar la eficacia de *A. daci* como agente de control biológico de *C. capitata* requiere de la disponibilidad continua de ejemplares de ambas especies. Por tanto, ha sido necesario establecer un sistema de cría estable, tanto del díptero como del parasitoide, en las instalaciones del IVIA.

2.3.1. Cría de *Ceratitis capitata*

La cría de mosca mediterránea de la fruta fue iniciada en el IVIA en el año 2002 a partir de fruta picada en campo, manteniéndose desde entonces en las cámaras climáticas 1 y 2 mencionadas anteriormente, siguiendo la metodología elaborada por Santiago (2005).

Esta cría artificial de *C. capitata* se mantiene en recipientes de metacrilato de dimensiones 40x30x30 cm (**Fig. 2.14a**), situados en el estante superior de las cámaras climáticas 1 y 2, en los que una de las caras laterales se ha cubierto con tela de muselina para permitir la aireación y que las moscas dispongan de una superficie para efectuar la puesta de los huevos (**Fig. 2.14b**). Además, en la cara superior de la caja de cría existen dos aberturas, también cubiertas con tela de muselina, donde se dispone parte del alimento para los adultos, consistente en una mezcla de azúcar y proteína hidrolizada (en proporción 4:1) (**Fig. 2.14c**).

Para completar esta dieta, en el interior de la caja se disponen un par de placas Petri con esa misma mezcla alimenticia, y dos botellas de agua, de cada una de las cuales sale una tira de bayeta que absorbe el agua por capilaridad; así, los dípteros toman el agua de la bayeta, sin disponer de espacio para introducirse en la botella. A través de este método se evitan ahogamientos y demás problemas que se puedan sufrir a la hora de tomar agua.

Partiendo de esta estructura, el proceso de cría se inicia con la puesta de huevos, por

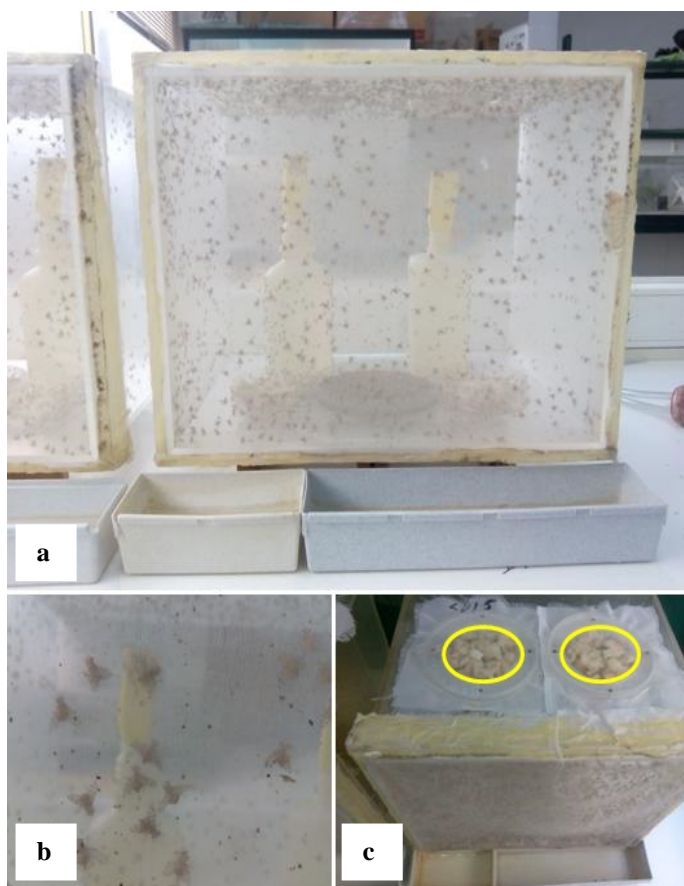


Figura 2.14. Caja de cría de *Ceratitís capitata*: **a)** Vista general, incluyendo las barquetas con agua para la recogida de huevos; **b)** Detalle de la tela de muselina, con varios ejemplares ovipositando sobre ella; **c)** Vista superior de la caja de cría, con las dos aberturas (en amarillo) donde se dispone parte de la alimentación para adultos de mosca (azúcar + proteína hidrolizada). Adicionalmente se aprecian las barquetas con agua donde caerán los huevos desde la tela. Fotografías: Luis de Pedro.

parte de las hembras adultas, en la tela de muselina lateral citada con anterioridad; bajo esta tela se disponen las barquetas de plástico con agua (**Fig. 2.8, 2.14a, 2.14c**) donde caerán los huevos, a lo cual se puede ayudar pasando un cepillo por la superficie de muselina. Los huevos recogidos de las diferentes cajas de cría (el número de cajas “en funcionamiento” es variable), serán sembrados sobre una dieta artificial de mosca¹, contenida en bandejas de plástico, que permite su óptimo desarrollo hacia fases posteriores. Esta dieta en bandejas, aparte de para mantener la propia cría de mosca, puede ser sembrada para el mantenimiento de la cría de parasitoides o para la elaboración de ensayos, siendo ligeramente distinto el proceso de siembra en cada caso.

¹ La composición de la dieta artificial para el desarrollo de inmaduros de *C. capitata* es invariable y aparece reflejada en la **Tabla 2.1**. Inmediatamente después de ser preparada, esta dieta se introduce en las bandejas de plástico antes citadas (con diferentes medidas según su finalidad), que se depositan en el arcón congelador del Laboratorio 1 para mantener intactas sus propiedades. Las bandejas que vayan a ser sembradas se sacan a descongelar unas horas antes de dicha siembra.

En el caso de la cría de mosca de la fruta, ésta requiere de una única siembra semanal de huevos sobre 800 gramos de dieta artificial, contenidos en una bandeja de plástico con dimensiones 30x20x4 cm. En concreto, la siembra consiste en recoger de manera volumétrica 0.4 ml de huevos, que producirán unos 8000 individuos, y distribuirlos uniformemente (mezclados con agua) con una pipeta sobre la dieta artificial. Esta bandeja conteniendo dieta+huevos se cubre con papel de aluminio, se introduce en un recipiente de plástico de dimensiones 30x25x20 cm (**Fig. 2.11b**) y se deja evolucionar en la cámara climática 1 (27 ± 1 °C de temperatura, $65 \pm 10\%$ de humedad relativa y 16:8 (L:O) de fotoperíodo). Los huevos eclosionan



Figura 2.15. Bandeja con dieta artificial conteniendo larvas L3 de *C. capitata* (en amarillo). La flecha roja señala aquellas larvas que han saltado de la bandeja al suelo del recipiente que la contiene, muchas de las cuales ya han pupado. Fotografía: Luis de Pedro.

y las larvas comienzan a desarrollarse en la dieta artificial (donde disponen de alimento y protección) hasta alcanzar la fase L3, saltar de la bandeja y pupar en el suelo del recipiente (**Fig. 2.15**). Las pupas son recogidas pasado un tiempo prudencial (tres semanas desde la siembra de los huevos), usándose un volumen de 80 ml (unas 4000 pupas) para, depositadas en una placa Petri, introducirlas en una nueva caja de cría sin ejemplares y reiniciar el ciclo tras su emergencia, unos días después.

Tabla 2.1. Composición de la dieta artificial para la cría de *Ceratitis capitata* (Wiedemann).

Componente	Cantidad	Función en la dieta
Salvado de trigo	1100 gr	Nutrición
Azúcar	308 gr	Nutrición
Levadura de cerveza	159.72 gr	Nutrición
Benzoato de sodio	11 gr	Conservante
Nipasol (Parahidroxibenzoato de propilo)	12.32 gr	Antibacteriana y antifúngica
Nipagin (Parahidroxibenzoato de metilo)	12.32 gr	Principalmente antibacteriana
Agua	1700 ml	Nutrición, humidificación, etc.

2.3.2. Cría de *Aganaspis daci*

Tras la primera cita de *Aganaspis daci* en la Comunidad Valenciana en el año 2009, la cría de este insecto se inició en el IVIA en 2010, a partir de ejemplares recuperados de puparios de *C. capitata* recolectados en la localidad valenciana de Bétera. Además, dicha cría se completó, en sus inicios, con ejemplares importados de Grecia (University of Thessaly, Volos, Magnisias) una vez se pudo constatar –mediante estudios morfológicos– que los ejemplares griegos y españoles poseían la misma identidad específica. Desde entonces, esta cría se mantiene en la cámara climática 2 mencionada anteriormente (condiciones climáticas: 24 ± 1 °C; humedad relativa de $65 \pm 10\%$ y 16:8 (L:O) de fotoperíodo).

Partimos de ejemplares adultos del parasitoide en el interior de cajas de cría de polipropileno de dimensiones 35x30x35 cm, cuyas caras laterales y superior están provistas de ventanas selladas con tela de muselina (**Fig. 2.16a**). El propósito de las ventanas laterales es la aireación y la alimentación de los parasitoides (ya que sobre una de ellas se extiende cada día una pizca de miel), mientras que en la ventana superior se depositan, diariamente, larvas L2-L3 de *C. capitata* que se usarán como base para el inicio de nuevas cajas de cría. En el interior de las cajas, y tal y como hemos visto en el apartado anterior, se colocan dos botellas de agua con tiras de bayeta absorbente para el aporte de agua y, adicionalmente, una placa Petri con azúcar para complementar la alimentación de los adultos.

El proceso de cría se inicia con el aporte de larvas de mosca a los adultos maduros de las cajas de cría. Estas larvas provienen de una siembra de huevos procedentes de las cajas de cría de mosca, siembra que, como se ha citado en el apartado anterior, es ligeramente diferente a la que se lleva a cabo para el mantenimiento de la cría de mosca. En este caso, para la cría de *A. daci* deben sembrarse huevos de mosca a diario, sembrándose varias bandejas por día; las bandejas con dieta son, además, de tamaño más reducido que las usadas para la cría de mosca (20x12x3cm), y contienen aproximadamente unos 300 gramos de dieta artificial. Por tanto, el volumen de huevos sembrados por bandeja será también inferior (aproximadamente 0.25 ml, que equivalen a unos 5000 individuos). Estas bandejas con huevos sembrados también se cubren con papel de aluminio en el interior de recipientes de plástico de 30x25x20 cm (**Fig. 2.11b**) y se dejan evolucionar en la cámara climática 1. En estas condiciones, al cabo de una semana, en las bandejas se presentan larvas que tienden a su último estado (L2-L3) y, por tanto, susceptibles a ser parasitadas por *A. daci*. Aparte de para la cría de este parasitoide, estas larvas también serán usadas para los ensayos de actividad parasitaria.

En el caso de la cría, lo que se hace es tomar larvas L2-L3 (mezcladas con dieta) de esas bandejas, con una cuchara, y depositarlas sobre la ventana superior de muselina de las cajas de

cría, cubriendo toda la superficie de la misma (**Fig. 2.16b**). Dichas larvas serán, además, cubiertas con otra tela de muselina acoplada perfectamente mediante cinta magnética, evitando de esta manera que puedan escapar (**Fig. 2.16c**). Así tendremos larvas mezcladas con dieta, confinadas en un espacio reducido, y accesibles para las hembras del parasitoide, que podrán acceder a ellas desde el interior de la caja, clavando su ovipositor a través de la tela de muselina (**Fig. 2.16d**).

El ofrecimiento de larvas se prolonga durante 24 horas, siendo recogidas tras ese tiempo y depositadas en cajas de emergencia de 20x15x10 cm (**Fig. 2.10**) en la cámara climática 2, donde podrán pupar y evolucionar en condiciones adecuadas. En estas cajas de emergencia, las larvas no parasitadas darán lugar a adultos de *C. capitata* al cabo de 8-10 días, mientras que las que hayan sido parasitadas comenzarán a emerger en forma de adultos de *A. daci* a partir de los 22-23 días tras la retirada de las larvas. En el momento en que comienzan a emerger adultos del parasitoide, el contenido de las cajas de emergencia (ya con las moscas muertas) se vuelca en una nueva caja de cría, reiniciándose el proceso.

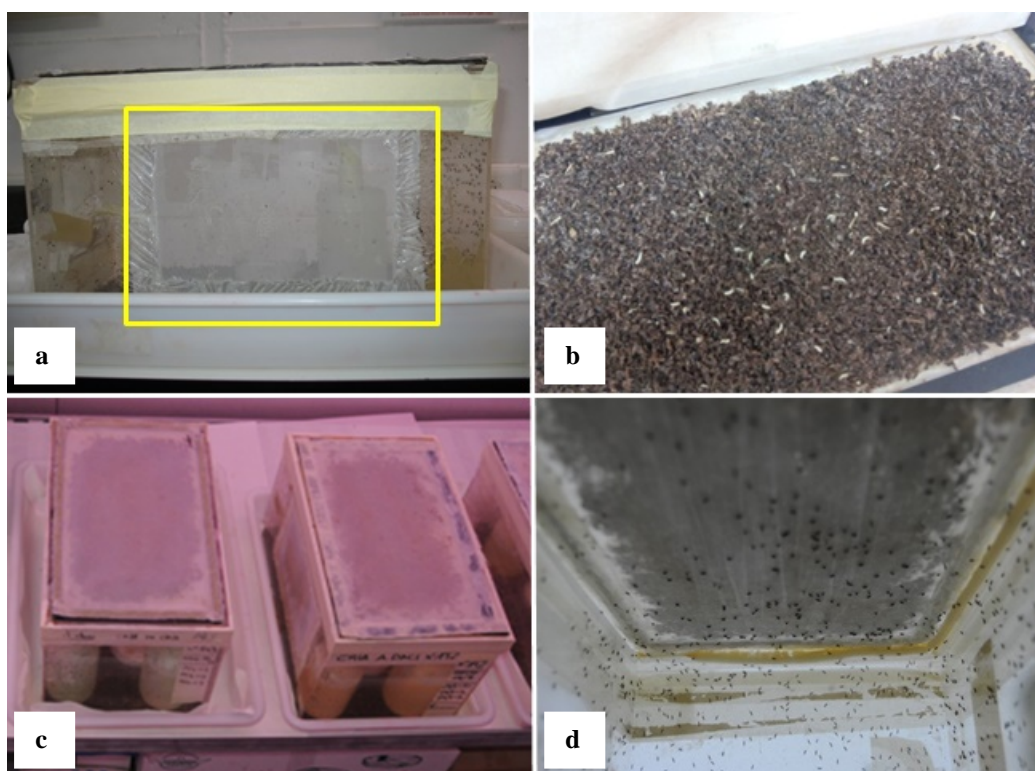


Figura 2.16. Cajas de cría de *A. daci*: **a)** Vista lateral: en amarillo, ventana lateral de muselina para la aireación y el aporte de miel; **b)** Vista superior: larvas L2-L3, mezcladas con dieta, dispuestas sobre la ventana superior de la caja de cría; **c)** Vista superior: larvas L2-L3, mezcladas con dieta, confinadas en la ventana superior de la caja de cría a través de un cierre de tela de muselina con cinta magnética; **d)** Vista interior: ejemplares de *A. daci* parasitando las larvas ofrecidas a través de la ventana superior. Fotografías: Luis de Pedro.

2.4. MÉTODOS

Más allá de la metodología particular empleada en cada ensayo, hay una serie de procesos que se han repetido de manera generalizada en varios de los ensayos constituyentes de este trabajo de investigación:

2.4.1. Recogida de parasitoides y depósito en unidades de ensayo

Todos aquellos ensayos en los que se han estudiado parámetros demográficos de *Aganaspis daci* (longevidad, actividad parasitaria, etc.) han requerido la captura de imagos del parasitoide desde sus cajas de cría y su posterior depósito en el recipiente o unidad de ensayo correspondiente en cada caso.

La captura de adultos de *A. daci* para el desarrollo de los ensayos se produjo mediante



Figura 2.17. Aspirador entomológico empleado para la captura de individuos adultos de *A. daci*. En el centro de la imagen, puntas de pipeta utilizadas como extremos de este instrumento (se aspira por el extremo amarillo y los individuos quedan atrapados en el extremo azul). Fotografía: Francisco Beitia.

un proceso de aspiración, empleando aspiradores entomológicos (**Fig. 2.17**). A través de este método se aspiraban individuos jóvenes, normalmente en su primera semana de vida (momento en que alcanzan su mayor actividad parasitaria (Martínez-Torres, 2011)) e, incluso, recién emergidos para los ensayos de longevidad. En la mayor parte de casos los individuos se aspiraban directamente desde las cajas de cría, abriendo la manga de la cara posterior; en otros casos, para la obtención de neonatos, se aislaban pupas maduras en tubos Eppendorf®, de los que se aspiraban los imagos recién emergidos.

Los individuos aspirados pasaban entonces a depositarse en los recipientes o unidades de ensayo correspondientes a cada experimento. Para ello, normalmente se disponía un pequeño trozo de papel acolchado sobre el suelo del recipiente, sobre el cual se soltaban cuidadosamente los ejemplares del parasitoide desde el aspirador, amortiguando así el impacto del insecto contra la superficie y los posibles daños sufridos por éste.

2.4.2. Ofrecimiento de larvas de *Ceratitis capitata* al parasitoide

En todos aquellos ensayos en los que se estudió la actividad parasitaria de *A. daci* sobre *C. capitata*, se produjo el ofrecimiento de larvas de mosca al parasitoide. Como ya se ha citado anteriormente, el último estado larvario de la mosca (fase L3) es el verdaderamente susceptible

al parasitismo de *A. daci*, si bien parece ser que este parasitoide puede actuar también sobre la fase L2 tardía de *C. capitata*. Así pues, en varios ensayos de este trabajo de tesis, al igual que en la cría, se ofrecieron larvas L2-L3 de *C. capitata* a individuos adultos de *A. daci*, ofrecimiento que se llevó a cabo en dos formas distintas: con las larvas mezcladas con dieta artificial; o a través de fruta infestada artificialmente.

2.4.2.1. Ofrecimiento de larvas en dieta

Los huevos recogidos de las cajas de cría de *C. capitata* se sembraban, para su evolución, en bandejas de plástico con distintos volúmenes de dieta artificial en función del uso que se les fuese a dar. En concreto, las bandejas de menor tamaño (20x12x3cm; capacidad para 300 gr de dieta artificial) se utilizaban para el ofrecimiento de larvas a los parasitoides, bien para el mantenimiento de sus crías o bien para la realización de ensayos. Así, siguiendo el procedimiento citado en el apartado 2.3.2, en estas bandejas la fase L2-L3 se alcanzaba pasados unos 7 días desde la siembra de los huevos, con unas 5000 larvas por bandeja.

A partir de aquí, el ofrecimiento de larvas al parasitoide para la realización de ensayos de parasitismo es ligeramente diferente al que se produce en el proceso de cría; en los ensayos, el número de larvas ofrecidas al parasitoide debía ser exacto, con el fin de obtener unos resultados fidedignos. Así pues, la realización de ensayos de este tipo requería del aislamiento de las larvas de la dieta para su conteo y posterior ofrecimiento. Para ello, lo que se hacía era disponer, en un vaso de precipitado, agua con azúcar disuelto en proporción 5:1; a esta disolución se le añadía, usando una cuchara, una cierta cantidad (3-4 cucharadas) de la mezcla de “dieta+larvas” de la bandeja, de tal modo que la presencia de azúcar hacía que dichas larvas se mantuviesen en la superficie, precipitando la dieta hacia el fondo del vaso. Las larvas que quedaban en la superficie se recogían con un colador, y se disponían sobre una placa Petri. Así, con unas simples pinzas blandas entomológicas, estas larvas L2-L3 podían ser recogidas una a una y puestas a disposición del parasitoide, depositándolas sobre la ventana superior de muselina de los recipientes de plástico de 20x15x10 cm vistos en el apartado 2.2.1.2 (con ventana superior rodeada de bandas magnéticas; **Fig. 2.11a**), donde se introducían los adultos de *A. daci*. Con el fin de reducir la movilidad de las larvas y así facilitar el acceso a éstas de los parasitoides a través de la muselina, sobre las larvas depositadas sobre la ventana superior se añadían un par de cucharadas de dieta fresca de mosca. Finalmente, sobre todo ello se disponía otra tela de muselina acoplada a la caja mediante cinta magnética, evitando así que las larvas escapasen (**Fig. 2.18**).



Figura 2.18. Detalle de larvas con dieta artificial confinadas en la ventana superior de una caja de emergencia modificada para ensayos de actividad parasitaria (ver Figura 2.11a). Se puede apreciar la tela de muselina rodeada de cintas magnéticas, evitando el escape de las larvas. Fotografía: Luis de Pedro.

2.4.2.2. Ofrecimiento de larvas en fruta

El otro modo de ofrecer larvas de *C. capitata* a *A. daci* durante este trabajo de investigación fue a través de la exposición de fruta artificialmente infestada; diferentes piezas de un mismo tipo de fruta eran ofrecidas al parasitoide tras haberse dispuesto un número determinado de larvas de mosca en su interior. Así se reproducía, de una manera lo más fiable posible, la forma en que dicho parasitoide podría encontrarse las larvas de este hospedador en el medio natural.

La fruta elegida para llevar a cabo este proceso fue la manzana y, más concretamente, la variedad “Royal Gala”, debido a diversas cuestiones: por un lado, estudios previos (Martins *et al.*, 2010; Martínez-Torres, 2011) ya constataron la capacidad de *A. daci* de actuar sobre larvas en el interior de frutos de esta variedad de manzana; por otro lado, se trata de una fruta y una variedad cuya consistencia es idónea para su manipulación en este proceso; y, finalmente, su precio de mercado es asequible para la realización de ensayos que requieran de un número muy elevado de piezas.

El proceso de infestación se iniciaba con la realización, mediante el uso de un sacabocados, de una serie de agujeros (8 mm Ø) en la manzana; este proceso de perforación debía hacerse con sumo cuidado para no destruir el fragmento de manzana extraído, que sería usado con posterioridad. Una vez hechos los agujeros, se introducía un número fijo de 3 larvas L2-L3 de *C. capitata* en el interior de cada uno de ellos, larvas que habrían sido previamente aisladas según el procedimiento citado en el punto 2.4.2.1. Finalmente, con el fin de evitar el escape de las larvas, cada agujero se obstruía con los diferentes trozos de fruta extraídos previamente con el sacabocados, cortando la punta interior de éstos para evitar el aplastamiento

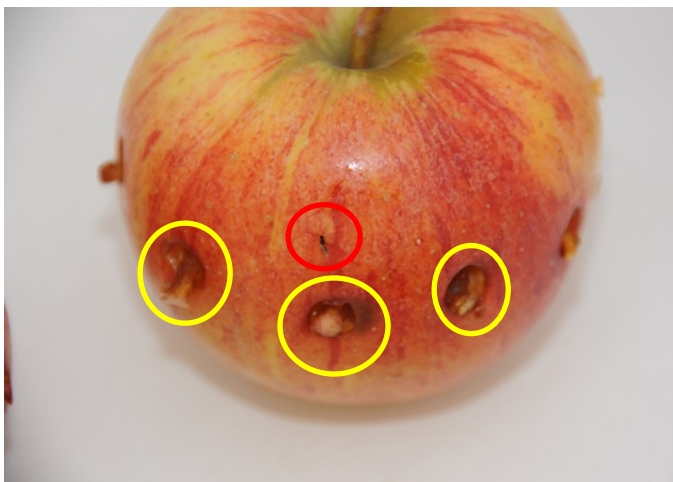


Figura 2.19. Detalle de una manzana (var. “Royal Gala”) artificialmente infestada con larvas de *C. capitata* para su ofrecimiento a *A. daci*. Se pueden apreciar varios orificios donde se han introducido las larvas, obstruidos por los trozos de manzana previamente extraídos (en amarillo). En rojo, un macho de *A. daci* reconoce la superficie del fruto. Fotografía: Luis de Pedro.

de las larvas (**Fig. 2.19**). El número de agujeros por fruta varió en los ensayos realizados en función de la densidad larvaria que se quisiera ofrecer al parasitoide en cada caso, siendo 10 (= 30 larvas/ fruto) el número más frecuentemente empleado. Una vez que las manzanas estaban infestadas, la forma de ofrecérselas al parasitoide también varió en función del ambiente y del ensayo; así, las diferentes maneras en que se llevó a cabo la oferta fueron las siguientes:

- En laboratorio: el ofrecimiento de fruta infestada en ensayos de laboratorio se llevó a cabo disponiéndola, sobre una base de vermiculita, en recipientes de plástico de medidas 30x25x20 cm (**Fig. 2.11b**), donde fruta y parasitoides permanecían confinados.
- En invernadero: los ensayos de parasitismo llevados a cabo en condiciones de semicampo tuvieron lugar en jaulones herméticamente cerrados en el invernadero (**Fig. 2.4b**) donde permanecían confinados los parasitoides y la fruta. Esta fruta se ofrecía de dos maneras distintas tratando de imitar su posible posición en el medio natural: por un lado, parte de las manzanas se disponían directamente sobre bandejas de plástico de medidas 40x33x16 cm, asentadas sobre el suelo del jaulón, imitando fruta caída en el suelo; por otro lado, el resto de manzanas se ofrecían colgadas artificialmente de un árbol, para lo cual eran individualmente introducidas en una malla de polietileno (1cm Ø) y anudadas aleatoriamente al ramaje de un plantón de naranjo dispuesto en el interior del jaulón (**Fig. 2.20**).
- En campo: el ofrecimiento de las manzanas infestadas en campo también se produjo de dos formas distintas según el ensayo realizado: la fruta cebo empleada para la detección en campo del parasitoide se disponía en recipientes de plástico de medidas 27x27x9 cm (**Fig. 2.11d**), con una base de vermiculita, colocados a su vez sobre palillos de madera de 25.6 cm de longitud cubiertos de pegamento anti-plagas. De esta manera, se evitaba el acceso al interior del recipiente (y, consecuentemente, a la fruta infestada) de

hormigas y otros artrópodos del suelo. Además, con palillos y la tapa de estos recipientes se construía un tejadillo que protegía a la fruta cebo de las precipitaciones (Fig. 2.21a).

Por su parte, en la valoración de la acción parasitaria en campo del parasitoide, la fruta infestada se confinaba individualmente junto con los parasitoides en cilindros de plástico de 15x20 cm (Fig. 2.11c) que se dejaban en campo. Dentro de estos cilindros, las manzanas se disponían sobre placas Petri con una base de vermiculita (Fig. 2.21b).

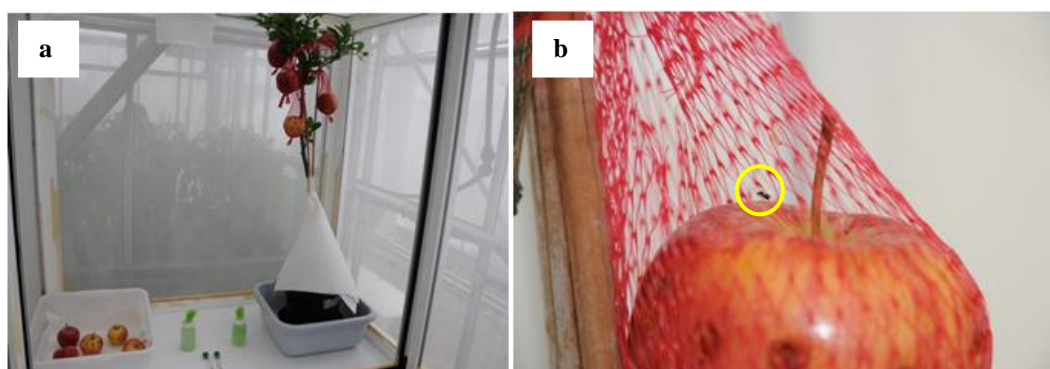


Figura 2.20. Ofrecimiento de fruta infestada al parasitoide en condiciones de semicampo: **a)** Vista general de un ensayo, donde se puede apreciar las dos formas en que la fruta fue ofrecida: sobre bandejas en el suelo del jaulón (izquierda) y colgadas de un árbol (derecha); **b)** Detalle del sistema utilizado para colgar la fruta del árbol; en amarillo, hembra de *A. daci* que ha accedido a la superficie del fruto. Fotografías: Francisco Beitia.

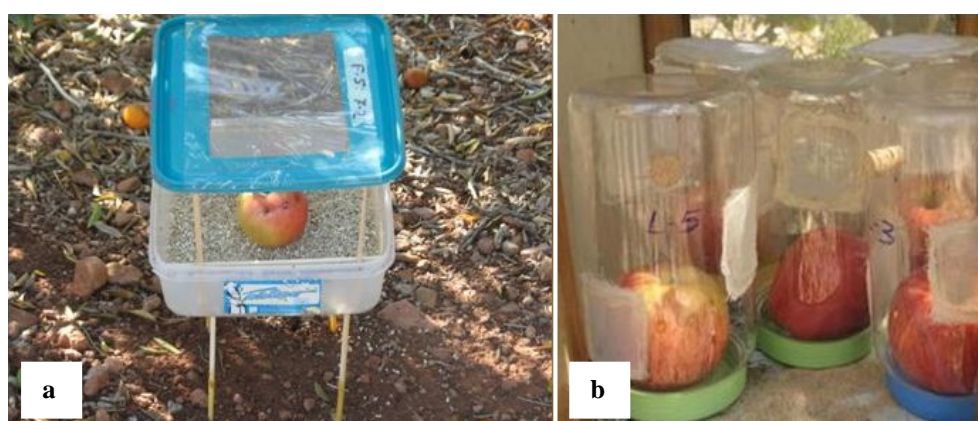


Figura 2.21. Ofrecimiento de fruta infestada al parasitoide en condiciones de campo: **a)** Recipiente con tejadillo (para proteger de las inclemencias del tiempo) utilizado para ofrecer fruta cebo en el ensayo de detección en campo de *A. daci*. Se pueden apreciar los palillos, impregnados con cola, que sostienen estos recipientes y evitan el acceso a la fruta de hormigas y otros peligros del suelo; **b)** Cilindros empleados en la evaluación de la acción parasitaria en campo de *A. daci*; en su interior se observan las manzanas infestadas. Fotografías: Luis de Pedro.

2.4.3. Recuperación y seguimiento de las larvas ofrecidas

Todos aquellos ensayos en los que se valoró la acción parasitaria de *A. daci* y en los que, por tanto, se produjo ofrecimiento de larvas, requirieron de un último paso que consistía en la recogida de esas larvas o pupas (pasado un tiempo prudencial para la acción del parasitoide) y su mantenimiento, en distintas condiciones, hasta que se completase su desarrollo.

Las larvas que hubiesen sido ofrecidas junto con dieta artificial se recogían mezcladas con ésta, con una cucharilla, y se depositaban en el interior de placas Petri perforadas (**Fig. 2.12**), donde la dieta se secaba sin permitir el desarrollo de microorganismos y las larvas/pupas completaban su desarrollo hacia adultos. Para evitar el escape de éstos tras su emergencia, frecuentemente estas placas Petri eran selladas mediante el uso de Parafilm. En el caso de los ensayos con fruta cebo, las larvas que saltaban de dicha fruta se recogían una a una con unas pinzas blandas, y se colocaban en las cajas de emergencia de 20x15x10 cm (**Fig. 2.10**), con una base de vermiculita para facilitar su pupación y desarrollo. La localización de las placas Petri y los recipientes de plástico donde se dejaban desarrollar las pupas variaba en función del experimento.

Transcurrido un tiempo prudencial de varias semanas (o incluso meses; el suficiente como para permitir la emergencia de los parasitoides de las pupas y la posterior muerte de éstos para evitar escapes durante su conteo), se procedía al conteo de los adultos emergidos (tanto moscas como parasitoides) y de las pupas que se mantenían cerradas (consideradas como muertas), y los parasitoides emergidos eran sexados; con ello, no sólo se obtenían las tasas de parasitismo generadas por el parasitoide, sino también la razón sexual de la descendencia.

2.5. ANÁLISIS DE DATOS Y METODOLOGÍA ESPECÍFICA

El tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo a través del paquete IBM SPSS Statistics (Versión 20.0 o anteriores). La metodología específica empleada en cada uno de los ensayos que componen este trabajo de tesis, así como los protocolos, aplicaciones estadísticas o programas concretos empleados se describirán en los capítulos correspondientes.

3. REFERENCIAS

- Aboussaid, H., Vidal-Quist, J. C., Oufdou, K., El Messoussi, S., Castañera, P., González-Cabrera, J.** 2011. Occurrence, characterization and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from argan fields in Morocco. *Environ Technol* 32(11-12): 1383-1391.
- Agrios, G. N.** 1997. Plant pathology. Academic Press, New York, USA. 635 pp.
- Aluja, M.** 1999. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) research in Latin America: myths, realities and dreams. *An Soc Entomol Bras* 28: 565-594.
- Aluja, M., Birke, A.** 1993. Habitat use by adults of *Anastrepha obliqua* in a mixed mango and tropical plum orchard. *Ann Entomol Soc Am* 80: 799-812.
- Andleeb, S., Shahid, M. S., Mehmood, R.** 2010. Biology of parasitoid *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Eucoilidae). *Pak J Sci Ind R* 53(4): 201-204.
- Argilés, R., Tejedo, V.** 2007. La lucha contra la mosca de la fruta mediante la técnica del insecto estéril en la Comunitat Valenciana. *Levante Agrícola* 385: 157-162.
- Back, E. A., Pemberton, E.** 1918. The Mediterranean fruit fly in Hawaii. *U.S. Dep Agric Tech Bull* 536: 1-118.
- Baranowski, R., Glenn, H., Sivinski, J.** 1993. Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Fla Entomol* 76(2): 245-251.
- Batkin, T. A.** 1995. Impact of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), on California agriculture. En: Heitz, J. R., Downum, K. R. (Eds.). Light-Activated Pest Control, ACS Symposium Series 616. American Chemical Society, Washington DC, USA, pp. 70-81.
- Bautista, R. C., Mochizuki, N., Spencer, J. P., Harris, E. J., Ichimura, D. M.** 1999. Mass-rearing of the tephritid fruit fly parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae). *Biol Control* 15: 137-144.
- Beitia, F., Hermoso de Mendoza, A., Pérez-Hinarejos, M., Falcó, J. V.** 2002. Posibilidades de control biológico de la mosca de la fruta, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), por medio de parasitoides exóticos. *Phytoma España* 140: 13-17.
- Beitia, F., Pérez-Hinarejos, M., Santiago, S., Garzón, E., Tarazona, I., Malagón, J., Falcó, J. V.** 2006. Expectativas en el control biológico de *Ceratitis capitata*: parasitoides exóticos y autóctonos. *Levante Agrícola* 379: 60-66.

- Beitia, F., Alonso, M., Asís, J. D., Gayubo, S. F., Tormos, J.** 2010. Nuevo método de cría de *Spalangia cameroni* (Hymenoptera, Pteromalidae), calcidoideo de uso potencial en el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Terralia* 78: 36-40.
- Beitia, F., Sabater-Muñoz, B., Malagón, J.** 2011. Estrategias de manejo integrado de la mosca mediterránea de la fruta en la Comunidad Valenciana. *Vida Rural* 323: 40-46.
- Beitia, F., Ferrara, F. A., Harbi, A., de Pedro, L., Tormos, J., Sabater-Muñoz, B.** 2014. Avances en el control biológico de la mosca de la fruta. *Vida Rural* 379: 34-39.
- Benavent, S.** 2010. Estudio comparativo de dos especies de parasitoides como agentes de control biológico de *Ceratitis capitata*. Trabajo de Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. 80 pp.
- Bodenheimer, F. S.** 1951. Citrus entomology in the middle east. Dr. W. Junk, The Hague, The Netherlands. 663 pp.
- Bonnemaison, L.** 1964. Enemigos animales de las plantas cultivadas y forestales. Ediciones de Occidente, Barcelona, España. 605 pp.
- Cánovas, C.** 1940. La lucha biológica contra *Ceratitis capitata* Wied. y orientaciones para su aplicación en España. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* 9: 72-106.
- Castañera, P.** 2003. Control integrado de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. *Phytoma España* 153: 131-133.
- Castañera, P.** 2007. La unidad asociada de entomología IVIA-CIB y su papel en el control de *Ceratitis capitata*. *Levante Agrícola* 385: 89-90.
- Castillo, M. A., Moya, P., Hernández, E., Primo Yúfera, E.** 2000. Susceptibility of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. *Biol Control* 19: 274-282.
- [CEE] Comunidad Económica Europea.** 1991. Anexo I de la directiva 91/414 del Consejo, del 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.
- Christenson, L. D., Foote, R. H.** 1960. Biology of fruit flies. *Annu Rev Entomol* 5: 171-192.
- Chueca, P.** 2007. Mecanización de métodos de control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) en cítricos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 246 pp.
- Cisneros, F. H.** 1995. Control de plagas agrícolas. AGLIS Electronics, Lima, Perú. 313 pp.

- Clausen, C. P.** 1978. Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world reviews. *U.S. Department of Agriculture Handbook* 480: 320-335.
- Clausen, C. P., Clancy, D. W., Chock, Q. C.** 1965. Biological control of the Oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. *U. S. Department of Agriculture Technical Bulletins* 1322: 1-102.
- Couso-Ferrer, F., Arouri, R., Beroiz, B., Perera, N., Cervera, A., Navarro-Llopis, V., Castañera, P., Hernández-Crespo, P., Ortego, F.** 2011. Cross-resistance to insecticides in a malathion-resistant strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol* 104(4): 1349-1356.
- Crane, E.** 1972. Pollination of seed crops. Bee Research Association, London, UK. 163 pp.
- Daly, H. V., Doyen, J. T., Ehrlich, P. R.** 1978. Introduction to insect biology and diversity. McGraw-Hill, New York, USA. 546 pp.
- Davies, R. G.** 1991. Introducción a la entomología. Mundi-Prensa, Madrid, España. 449 pp.
- Davies, N., Villafranca, F. X., Roderick, G. K.** 1999. Bioinvasions of the medfly *Ceratitis capitata*: source estimation using DNA sequences at multiple intron loci. *Genetics* 153: 351-360.
- De Bach, P.** 1974. Biological control by natural enemies. Cambridge University Press, London, UK. 323 pp.
- De Bach, P., Rosen, D.** 1991. Biological control by natural enemies. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 440 pp.
- De Brême, F.** 1842. Note sur le genre *Ceratitis* de MacLeay (Diptera). *Ann Soc Entomol Fr* 11: 183-190.
- de Jong, Y. et al.** 2017. Fauna Europaea - all European animal species on the web. *Biodiversity Data Journal* 2: e4034. doi: [10.3897/BDJ.2.e4034](https://doi.org/10.3897/BDJ.2.e4034).
- Del Pino, A.** 2000. Efecto de los factores abióticos y edáficos naturales en el ciclo biológico de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 217 pp.

- Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., Ekesi, S., Mueke, J. K.** 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Wiedemann), *C. rosa* var. *fasciventris* (Karsch) and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia* 156: 375-382.
- Domínguez García-Tejero, F.** 1989. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. 9ª Edición. Mundi-Prensa, Madrid, España. 821 pp.
- Duyck, P. F., Quilici, S.** 2002. Survival and development of different life stages of three *Ceratitis* spp. (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures. *B Entomol Res* 92: 461-469.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C.** 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol* 46: 387-400.
- El-Heneidy, A. H., Ramadan, M. M.** 2010. *Bactrocera zonata* (Saunders) status and its natural enemies in Egypt. En: Sabater-Muñoz, B., Navarro-Llopis, V., Urbaneja, A. (Eds.). 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance Abstracts' Book. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, p. 115.
- Enkerlin, W. R.** 2005. Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique. En: Dyck V. A., Hendrichs, J., Robinson, A. S. (Eds.). Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 651-676.
- [EPPO] European and Mediterranean Plant Protection Organization.** 2017. PQR-EPPO database on quarantine pests. <http://www.eppo.int>
- Eskafi, F. M., Kolbe, M. M.** 1990. Predation on larval and pupal *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the ant *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) and other predators in Guatemala. *Environ Entomol* 19: 148-153.
- [Eurostat] Statistical Office of the European Communities.** 2012. Agriculture. www.ec.europa.eu/eurostat
- Evans, G. O.** 1992. Principles of acarology. CAB International, London, UK. 563 pp.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations.** 2016. Citrus Fruits Statistics: 2015. <http://www.fao.org/3/a-i5558e.pdf>

- Falcó, J. V., Pérez-Hinarejos, M., Santiago, S., Navarro, S., Beitia, F.** 2003. Introducción de parasitoides exóticos para el control de insectos plaga: procedimientos de importación y cuarentena. En: Capdevila-Argüelles, L., Zilletti, B., Pérez Hidalgo, N. (Coords.). Contribuciones al Conocimiento de las Especies Exóticas Invasoras. Grupo Especies Invasoras Ed., G.E.I. Serie Técnica 1, pp. 222-224.
- Flessel, P., Quintana, P. J. E., Hooper, K.** 1993. Genetic toxicity of malathion: a review. *Environ Mol Mutagen* 22: 7-17.
- Fletcher, B. S.** 1989. Ecology movements of tephritid fruit flies. En: Robinson, A. S., Hopper, G. (Eds.). World Crop Pest 3 (B). Fruit Flies; Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 209-219.
- Flint, M. L., Van den Bosch, R.** 1983. Introduction to integrated pest management. Plenum Press, New York, USA. 240 pp.
- García-Marí, F., Llorens, J. M., Costa-Comelles, J., Ferragut, F.** 1991. Ácaros de las plantas cultivadas y su control biológico. Pisa, Alicante, España. 175 pp.
- García-Marí, F., Ferragut, F.** 2002. Las plagas agrícolas. 3º Edición. Ed. Phytoma-España. 400 pp.
- Garrido, A., Ventura, J. J.** 1993. Plagas de los cítricos. Bases para el manejo integrado. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España. 183 pp.
- Garzón-Luque, E.** 2007. Efecto de la temperatura en los parámetros biológicos de *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Trabajo de Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. 75 pp.
- Gauld, I. D., Bolton, B.** 1988. The Hymenoptera. Oxford University Press, Oxford, UK. 438 pp.
- Gazit, Y., Rosler, Y., Glazer, I.** 2000. Evaluation of entomopathogenic nematodes for the control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Sci Techn* 10: 157-164.
- Glenn, H., Baranowski, R.** 1987. Establishment of *Trybliographa daci* (Eucoilidae, Hymenoptera) in Florida. *Fla Entomol* 70: 183.
- Godan, D.** 1983. Pests of slugs and snails. Biology and control. Springer Verlag, Berlin, Germany. 445 pp.

- Godfray, H. C. J.** 1994. Parasitoids: Behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA. 473 pp.
- Gómez-Clemente, F.** 1932. Un ensayo de lucha biológica contra la *C. capitata* en Valencia. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* 6: 80-89.
- Gómez-Clemente, F.** 1934. Los parásitos de la *C. capitata* Wied. Nuevos ensayos de importación y aclimatación. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* 7: 69-80.
- Gonçalves, R. S., Nava, D. E., Pereira, H. C., Lisbôa, H., Grützmacher, A. D., Valgas, R. A.** 2013. Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 106(6): 791-798.
- Gosálbez, J.** 1987. Insectívors i rosegadors de Catalunya. Ketres, Barcelona, España. 241 pp.
- Greaves, J. H.** 1984. La lucha contra los roedores en la agricultura. F.A.O. Roma. 88 pp.
- Guimaraes, J. A., Zucchi, R. A., Díaz, N. B., de Souza Filho, M. F., Uchoa, M. A.** 1999. Species of Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoids of frugivorous larvae (Diptera: Tephritidae and Lonchaeidae). *Biol Control* 40: 320-326.
- Guimaraes, J. A., Díaz, N. B., Zucchi, R. A.** 2000. Parasitóide – Figitidae (Eucoilinae). En: Malavasi, A., Zucchi, R. A. (Eds.). Moscas das Frutas de Importância Económica no Brasil: Conhecimento Básico e Aplicado. Holos Editora, Ribeirão Preto, Brasil, pp. 127-134.
- Guimaraes, J. A., Zucchi, R. A.** 2004. Parasitism behavior of three species of Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) fruit fly parasitoids (Diptera) in Brazil. *Neotrop Entomol* 33: 217-224.
- [GVA] Generalitat Valenciana.** 2016. Campaña contra la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* Wied.). Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural. Dirección general de producción agraria y ganadera. http://www.agroambient.gva.es/documents/163214705/163215037/Ceratitis_CapitataOK.pdf/5b31f305-596b-472c-b4c2-196be20421bc
- [GVA] Generalitat Valenciana.** 2017. Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural. Estadísticas agrícolas (2014). http://www.agroambient.gva.es/documents/162218839/163006853/ISAV2014_Cap4.pdf/78ccc04b-08b1-4866-83b3-d70d30ba427c

- Hafsi, A., Abbes, K., Harbi, A., Duyck, P. F., Chermiti, B.** 2015. Attract-and-kill systems efficiency against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and effects on non-target insects in peach orchards. *J Appl Entomol* 140(1-2): 28-36.
- Hajek, A. E.** 2004. Natural enemies. An introduction to biological control. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 378 pp.
- Harbi, A., Beitia, F., Tur, C., Chermiti, B., Verdú, M. J., Sabater-Muñoz, B.** 2015a. Field releases of the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* in Spain: First results on dispersal pattern. *Acta Horti* 1065(2): 1057-1062.
- Harbi, A., de Pedro, L., Chermiti, B., Sabater-Muñoz, B., Beitia, F., Ferrara, F. A.** 2015b. Utilización del parasitoide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) para el control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann): Ensayos de semi-campo. *Levante Agrícola* 428: 204-208.
- Harris, E. J., Bautista, R. C., Spencer, J. P.** 2000. Utilisation of the egg-larval parasitoid, *Fopius* (Biosteres) *arisanus*, for augmentative biological control of tephritid fruit flies. En: Tan, K. H. (Ed.). Area-Wide Control of Fruits Flies and Other Insects Pests. Penerbit University Sains Malaysia, Penang, Malaysia, pp. 725-732.
- Headrick, D. H., Goeden, R. D.** 1996. Issues concerning the eradication or establishment and biological control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in California. *Biol Control* 6: 412-421.
- Jacas, J., Caballero, P., Avilla, J.** 2005. El control biológico de plagas y enfermedades. Publicaciones de la Universidad Jaume I, Castellón de la Plana, España. 223 pp.
- Jacas, J., Urbaneja, A.** 2008. Control biológico de plagas agrícolas. Ed. Phytoma-España. 448 pp.
- Jeppson, L. R., Keiffer, H. H., Baker, E. W.** 1975. Mites injurious to economic plants. University of California Press, Berkeley, CA, USA. 614 pp.
- Jiménez-Jiménez, E.** 1956. Las moscas de la fruta y sus enemigos naturales. *Fitófilo* 16: 4-11.
- Juan-Blasco, M.** 2012. Control biorracional de *Ceratitis capitata* (Wiedemann): Mejora, aplicación y evaluación de la técnica del insecto estéril. Tesis Doctoral. Universitat Jaume I de Castellón. 223 pp.

- Lance, D. R., McInnis, D. O.** 2005. Biological basis of the sterile insect technique. En: Dyck, V. A., Hendrichs, J., Robinson, A. S. (Eds.). *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 69-94.
- Leblanc, L., Vargas, R. I., Rubinoff, D.** 2010. Attraction of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and endemic and introduced nontarget insects to Biolure bait and its individual components in Hawaii. *Environ Entomol* 39: 989-998.
- Liquido, N. J., Shinoda, L. A., Cunningham, R. T.** 1991. Host plants of the Mediterranean fruit fly, *C. capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 77: 1-52.
- Llorens, J. M.** 2002. Consideraciones sobre la mosca del mediterráneo (*C. capitata* Wied). *Phytoma España* 138: 46-49.
- Lozano-Tovar, M. D., Garrido-Jurado, I., Lafont, F., Quesada-Moraga, E.** 2015. Insecticidal activity of a destruxin-containing extract of *Metarhizium brunneum* against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol* 108(2): 462-472.
- Lux, S. A., Ekesi, S., Dimbi, S., Mohamed, S., Billah, M.** 2003. Mango-infesting fruit flies in Africa: perspectives and limitations of biological approaches to their management. En: Neuenschwander, P., Borgemeister, C., Langewald, J. (Eds.). *Biological Control in IPM Systems in Africa*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 277-293.
- [MAPAMA] Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.** 2017a. Estadística anual de consumo de productos fitosanitarios. <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/estadisticas-medios-produccion/fitosanitarios.aspx>
- [MAPAMA] Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente.** 2017b. Frutas y hortalizas: Superficie y producción. http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/tablawebspffhh_tcm7-318715.pdf
- Manousis, T., Moore, N. F.** 1989. The search of viruses pathogenic for the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmelin. En: Cavalloro, R. (Ed.). *Fruit Flies of Economic Importance*. Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium, Rome, Italy, pp. 349-353.

- Mañosa, S., Mateo, R., Guitart, R.** 2001. A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environ Monit Assess* 71: 187-205.
- Martínez-Ferrer, M. T., Alonso Muñoz, A., Campos Rivela, J. M., Fibla Queralt, J. M., García-Marí, F.** 2007. Dinámica poblacional de la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* en tres zonas citrícolas mediterráneas. *Levante Agrícola* 385: 92-98.
- Martínez-Torres, R.** 2011. Determinación de la eficacia de *Aganaspis daci* (Weld, 1951) como agente de control biológico de *Ceratitis capitata* (Wiedemann), la mosca mediterránea de la fruta. Trabajo de Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia. 150 pp.
- Martins, D. S., Skouri, W., Chermiti, B., Aboussaid, H., El Messoussi, S., Oufdou, K., Carbonell, E., Sabater-Muñoz, B., Beitia, F.** 2010. Analysis of two larval-pupal parasitoids (Hymenoptera, Braconidae) in the biological control of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) in Spanish Mediterranean areas. En: Sabater-Muñoz, B., Navarro-Llopis, V., Urbaneja, A. (Eds.). Proceedings of the 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España, pp. 252-258.
- Mau, R., Kessing, J.** 1992. “*Ceratitis capitata* (Wiedemann)”. <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/ceratiti.htm>
- Metcalf, R. L.** 1995. The need for research on exotic pest in California. En: Morse, J. G., Metcalf, R. L., Carey, J. R., Dowell, R. V. (Eds.). The Medfly in California: Defining Critical Research. University of California, Center for Exotic Pest Research, Riverside, CA, USA, pp. 5-39.
- Midgarden, D., Ovalle, O., Epsky, N. D., Puche, H., Kendra, P. E., Rendón, P., Heath, R. R.** 2004. Capture of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in dry traps baited with a food-based attractant and Jackson traps baited with trimedlure during sterile male release in Guatemala. *J Econ Entomol* 97: 2137-2143.
- Mills, N. J.** 2009. Parasitoids. En: Resh, V. H., Cardé, R. (Eds). Encyclopedia of Insects. 2nd Edition. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 845-848.
- Moner, J. P., Petit, V. R., Bernat, J.** 1988. La mosca de las frutas (*C. capitata* W.). Ed. Servei de Protecció dels Vegetals, Conselleria d’Agricultura i Pesca, Generalitat Valenciana, Almassora, España. 60 pp.

- Montoya, P.** 1999. Evaluación de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) como agente de control biológico aumentativo de *Anastrepha spp.* (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. 87 pp.
- Montoya, P., Toledo, J., Hernández, E.** 2010. Moscas de la fruta: Fundamentos y procedimientos para su manejo. S y G editores, México D.F., México. 394 pp.
- Monzó, C., Vanaclocha, P., Outerelo, R., Ruiz-Tapiador, I., Tortosa, D., Pina, T., Castañera, P., Urbaneja, A.** 2005. Catalogación de especies de las familias Carabidae, Cicindelidae y Staphylinidae en el suelo de los cítricos de la provincia de Valencia, España. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 31: 483-492.
- Monzó, C., Sabater-Muñoz, B., Urbaneja, A., Castañera, P.** 2010. Tracking medfly predation by the Wolf spider, *Pardosa cribata* Simon, in citrus orchards using PCR-based gut-content analysis. *B Entomol Res* 100: 145-152.
- Monzó, C., Sabater-Muñoz, B., Urbaneja, A., Castañera, P.** 2011. The ground beetle *Pseudophonus rufipes* revealed as predator of *Ceratitis capitata* in citrus orchards. *Biol Control* 56(1): 17-21.
- [NAS] National Academy of Sciences.** 1978. Problemas y control de plagas de vertebrados. Limusa, México D.F., México. 175 pp.
- Nasca, A. J.** 1973. Parásitos de 'moscas de los frutos' establecidos en algunas zonas de Tucumán. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* 10: 31-43.
- Navarro-Llopis, V.** 2009. La técnica de atracción y muerte: una apuesta de futuro para reemplazar el trampeo masivo. *Phytoma España* 213: 45-46.
- Navarro-Llopis, V., Vacas, S., Sanchís, J., Primo, J., Alfaro, C.** 2011. Chemosterilant bait stations coupled with Sterile Insect Technique: An integrated strategy to control the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol* 104(5): 1647-1655.
- Navarro-Llopis, V., Primo, J., Vacas, S.** 2013. Efficacy of attract-and-kill devices for the control of *Ceratitis capitata*. *Pest Manag Sci* 69(4): 478-482.
- Navarro-Llopis, V., Primo, J., Vacas, S.** 2015. Bait station devices can improve mass trapping performance for the control of the Mediterranean fruit fly. *Pest Manag Sci* 71(7): 923-927.

- Nunes, A., Müller, F. A., Gonçalves, R. S., García, M. S., Costa, V. A., Nava, D. E.** 2012. Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capao do Leao, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 42: 6-12.
- Núñez-Bueno, L.** 1982. *Trybliographa daci* Weld (Hymenoptera: Cynipidae): biology and aspects of the relationship with its host *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad de Florida. 153 pp.
- Oerke, C. E.** 2006. Crop losses to pests. *J Agr Sci* 144: 31-43.
- Ortego, F., Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Castañera, P.** 2005. Detección de resistencia a insecticidas en *Ceratitis capitata*: bases bioquímicas y moleculares. *Phytoma España* 173: 63-66.
- Ovruski, S. M.** 1994. Immature stages of *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae), a parasitoid of *Ceratitis capitata* (Wied.) and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). *J Hymenopt Res* 3: 233-239.
- Ovruski, S. M., Aluja, M.** 2002. Mating behavior of *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae, Eucoilinae), a fruit fly (Diptera: Tephritidae) larval parasitoid. *J Insect Behav* 15: 139-151.
- Papadopoulos, N. T., Carey, J. R., Katsoyannos, B. I., Koulossis, N. A.** 1996. Overwintering of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northern Greece. *Ann Entomol Soc Am* 89: 526-534.
- Papadopoulos, N. T., Katsoyannos, B. I.** 2003. Field parasitism of *C. capitata* larvae by *Aganaspis daci* in Chios, Greece. *Biocontrol* 48: 191-195.
- Paranhos, B. A. J., Mendes, P. C. B., Papadopoulos, N. T., Walder, J. M. M.** 2007. Dispersion patterns of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in citrus orchards in southeast Brazil. *Biocontrol Sci Techn* 17(4): 375-385.
- Peñarrubia-María, I. E.** 2010. Biology studies and improvement of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) mass trapping control technique. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida. 208 pp.
- Pérez-Hinarejos, M., Santiago, S., Falcó, J. V., Beitia, F.** 2006. Laboratory experiments with *Fopius arisanus*, an exotic egg-pupal parasitoid of *Ceratitis capitata*. *IOBC/WPRS Bull* 29(3): 209-213.

- Plus, N., Cavalloro, R.** 1983. The virus of *C. capitata* Wied. in vivo and in vitro. En: Cavalloro, R. (Ed.). Fruit Flies of Economic Importance. Proceedings of the CEC/IOBC International Symposium, Athens, Greece, pp. 106-112.
- Primo Yúfera, E.** 1991. Ecología química. Nuevos métodos de la lucha contra insectos. Mundi-Prensa y Banco de Crédito y Ahorro de Valencia, Madrid, España. 191 pp.
- Prokopy, R. J., Hendrichs, J.** 1979. Mating behavior of *Ceratitidis capitata* on a field-caged host tree. *Ann Entomol Soc Am* 72: 642-648.
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Santiago-Álvarez, C.** 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol* 99: 1955-1966.
- Ros, J. P.** 1988. La mosca mediterránea de la fruta, *C. capitata* Wied. Biología y métodos de control. Hojas divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España. N°8/88. 28 pp.
- Ruiz, S. L., Cancino, D. J. L., Aluja, M.** 1996. Colonización de parasitoides nativos para el control biológico de moscas de la fruta. En: Proceedings of the Second Meeting of the Working Group on Fruit Flies of the Western Hemisphere, Viña del Mar, Chile, p.70.
- Ruiz Castro, A.** 1945. Fauna entomológica de la vid en España. Estudio sistemático-biológico de las especies de mayor importancia económica III (Diptera). Trabajos del Instituto Español de Entomología (C.S.I.C), Madrid, España. 101 pp.
- Sabater-Muñoz, B., Tormos, J., de Pedro, L., Harbi, A., Tur, C., Briasco, M., Verdú, M. J., Beitia, F.** 2012. Estrategias de control integrado de *Ceratitidis capitata* en cítricos. *Vida Rural* 353: 42-45.
- Santiago, S.** 2005. Parasitismo de *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) por *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) en frutas mediterráneas. Trabajo de Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología. Universidad Politécnica de Valencia. 86 pp.
- Santiago, S., Pérez-Hinarejos, M., Garzón-Luque, E., Beitia, F., Falcó, J. V.** 2006. Parasitism of *Diachasmimorpha tryoni* on Mediterranean fruits infested with *Ceratitidis capitata* larvae in laboratory. *IOBC/WPRS Bull* 29(3): 205-208.

- Seo, S. T., Vargas, R. I., Gilmore, J. E., Kurashima, R. S., Fujimoto, M. S.** 1990. Sperm transfer in normal and gamma-irradiated, laboratory-reared Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol* 83: 1949-1953.
- Shelly, T. E., Edu, J., Pahio, E.** 2007. Age-dependent variation in mating success of sterile male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae): implications for sterile technique. *J Econ Entomol* 100(4): 1180-1187.
- Sivinski, J. M., Jeronimo, F., Holler, T.** 2000. Development of aerial releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid that attacks the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in the Guatemalan Highlands. *Biocontrol Sci Techn* 10: 15-25.
- Smith, R. F., Reynolds, H. T.** 1966. Principles, definitions and scope of integrated pest control. En: Proceedings of the FAO Symposium on Integrated Pest Control, Rome, Italy, pp. 11-17.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van den Bosch, R., Hagen, K. S.** 1959. The integrated control concept. *Hilgardia* 29: 81-101.
- Taylor, P. W., Kaspi, R., Mossinson, S., Yuval, B.** 2001. Age-dependent insemination success of sterile Mediterranean fruit flies. *Entomol Exp Appl* 98: 27-33.
- Thomas, M. C., Heppner, J. B., Woodruff, R. E., Weems, H. V., Steck, G. J., Fasulo, T. R.** 2010. Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae). Publication EENY-214. University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/in371>.
- Toledo, J., Liedo, P., Williams, T., Ibarra, J.** 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *J Econ Entomol* 92: 1052-1056.
- Tormos, J., Beitia, F., Alonso, M., Asís, J. D., Gayubo, S. F.** 2010. Assessment of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) pupae killed by heat or cold as hosts for rearing *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Ann Appl Biol* 156: 179-185.
- Tormos, J. (Dir.), Portillo, M. (Coord.), Asís, J. D., et al.** 2014. Entomología y control biológico [Libro en línea]. Salamanca: Cajaduero; Paiporta (Valencia): Sendemá. Disponible en: http://prisma.usal.es/libros/Entomologia_y_Control_Biologico/index.html. [Consulta: 17-09-2014]. ISBN e-book 978-84-694-0797-4.

- Urbaneja, A., Ripollés, J. L., Abad, R., Calvo, J., Vanaclocha, P., Tortosa, D., Jacas, J., Castañera, P.** 2005. Importancia de los artrópodos depredadores de insectos y ácaros en España. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 31: 209-223.
- Urbaneja, A., García-Marí, F., Tortosa, D., Navarro, C., Vanaclocha, P., BARGUES, L., Castañera, P.** 2006. Influence of ground predators on the survival of the Mediterranean fruit fly pupae, *Ceratitis capitata*, in Spanish citrus orchards. *Biocontrol* 51: 611-626.
- Urbaneja, A., Chueca, P., Montón, H., Pascual-Ruiz, S., Dembilio, O., Vanaclocha, P., Abad-Moyano, R., Pina, T., Castañera, P.** 2009. Chemical alternatives to malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish citrus orchards. *J Econ Entomol* 102: 144-151.
- Urbaneja, A., Catalán, J., Tena, A., Jacas, J.** 2012. Gestión Integrada de Plagas de Cítricos. <http://gipcitricos.ivia.es>
- Van Driesche, R. G., Bellows Jr., T. S.** 1996. Biological control. Chapman and Hall, New York, USA. 539 pp.
- Verdú, M. J., Falcó, J. V., Beitía, F., Sabater-Muñoz, B.** 2011. Identificación de un nuevo agente de control biológico de *Ceratitis capitata* en España, el himenóptero eucoilino *Aganaspis daci*. En: Libro de Resúmenes de las XXVIII Jornadas de la Asociación Española de Entomología (AeE), Ponferrada, España, p. 25.
- Vidal-Quist, J. C., Castañera, P., González-Cabrera, J.** 2010. Cyt1Aa protein from *Bacillus thuringiensis* (Berliner) serovar *israelensis* active against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). *Pest Manag Sci* 66: 949-955.
- Viejo-Montesinos, J. L., Ornos-Gallego, C.** 1997. Los insectos polinizadores: una aproximación antropocéntrica. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 20: 71-74.
- Weld, L. H.** 1951. A new species of *Trybliographa* (Hymenoptera: Cynipidae). *Proc Hawaii Entomol Soc* 14(2): 331-332.
- Wharton, R. A., Gilstrap, F. E., Rhodei, R. H., Fischel, M. M., Hart, W. G.** 1981. Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Costa Rica. *Entomophaga* 26: 285-290.

- Wharton, R. A., Ovruski, S. M., Gilstrap, F. E.** 1998. Neotropical Eucilidae (Cynipoidea) associated with fruit infesting Tephritidae, with new records from Argentina, Bolivia and Costa Rica. *J Hymenopt Res* 7: 102-115.
- Wharton, R. A., Yoder, M. J.** 2017. Parasitoids of Fruit-Infesting Tephritidae. <http://paroffit.org>.
- White, I. M., Elson-Harris, M. M.** 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. 601 pp.
- Whittier, T. S., Kaneshiro, K. Y., Prescott, L. D.** 1992. Mating behavior of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a natural environment. *Ann Entomol Soc Am* 85: 214-218.
- Williams, T., Valle, J., Viñuela, E.** 2003. Is the naturally derived insecticide Spinosad compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Sci Techn* 13: 459-475.
- Wong, T. T. Y., McInnis, D. O., Nishimoto, J. I., Ota, A. K., Chang, V. C. S.** 1984. Predation of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) by the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae) in Hawaii. *J Econ Entomol* 77(6): 1454-1458.
- Wright, E., Inglis, I., Feare, C.** 1980. Birds problems in agriculture. British Crop Protection Council, Croydon, UK. 210 pp.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de tesis, en base a lo expuesto anteriormente en el capítulo introductorio, es evaluar la aptitud de *Aganaspis daci* como agente de control de *Ceratitis capitata* en la Cuenca Mediterránea, así como determinar la forma óptima de utilizar a este parasitoide en los programas de control biológico de dicho díptero y los factores a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo su cría y su liberación.

Para alcanzar este propósito, la presente tesis se ha desarrollado respondiendo a los siguientes objetivos parciales:

1. Confirmar, a través de análisis moleculares, que los ejemplares encontrados en la Comunidad Valenciana en 2009 y 2010 y determinados a partir de rasgos o atributos morfológicos como *Aganaspis daci*, corresponden realmente a esta especie, y valorar la presencia en campo, de manera natural, de este parasitoide en este área mediterránea.
2. Describir el desarrollo y los aspectos morfológico-funcionales de las fases preimaginales de *A. daci*, así como las estructuras sensoriales imaginales, tanto de esta especie como de *Aganaspis pelleranoi*, con objeto de facilitar la identificación de sus estados inmaduros y de discernir la función que tienen las sensilas de los parasitoides de este género en la localización y evaluación de sus hospedadores.
3. Valorar el efecto que tiene la temperatura sobre ciertos aspectos de la biología de *A. daci*, tales como su longevidad, su tiempo de desarrollo, la supervivencia de sus inmaduros o la razón sexual de su descendencia, y determinar las constantes t_0 (umbral mínimo de desarrollo) y K (integral térmica) para esta especie.
4. Determinar el tipo de reproducción mostrado por este parasitoide sobre *Ceratitis capitata* mediante la comparación de la descendencia obtenida a partir de hembras fecundadas y vírgenes, así como el propio efecto que el emparejamiento o “mating” tiene sobre otros parámetros biológicos de *A. daci*.
5. Confirmar la presencia del fenómeno de superparasitismo en *A. daci* cuando actúa sobre *C. capitata*, en función de la disponibilidad de hospedador y la densidad local de hembras del parasitoide, considerados tradicionalmente como dos factores clave en la decisión de superparasitar.
6. Establecer la influencia que tienen las condiciones climáticas mediterráneas sobre la actividad parasitaria de *A. daci*, concretamente sobre parámetros tales como el porcentaje de parasitismo que genera, la mortalidad que induce y, en definitiva, la reducción poblacional que causa sobre *C. capitata*.

7. Describir la respuesta funcional mostrada por este parasitoide en función de diversos factores, tales como las condiciones climáticas bajo las que actúe (laboratorio o invernadero) o la forma en que se presenten los hospedadores (en dieta artificial o en el interior de frutos).

NOTA: Los presentes objetivos se han desarrollado a lo largo de los siguientes seis capítulos. Cada capítulo corresponde a un artículo, publicado o enviado, cuya estructura se ha modificado ligeramente para adecuarse a la propia estructura de la tesis, si bien se ha mantenido el estilo editorial de la revista correspondiente. Por ello, existen ligeras diferencias en el estilo de las citaciones bibliográficas a las que se hace referencia.

CAPÍTULO 1

“First field record and surveillance of *Aganaspis daci* on citrus fields affected by *Ceratitis capitata* in Spain”

Primera cita y seguimiento de *Aganaspis daci* en campos de cítricos afectados por *Ceratitis capitata* en España

Luis de Pedro, Francisco Beitia, José Vicente Falcó, Nikos T. Papadopoulos, Josep Daniel Asís, José Tormos, Beatriz Sabater-Muñoz

Una versión de este capítulo ha sido enviada para su publicación:

de Pedro, L., Beitia, F., Falcó, J. V., Papadopoulos, N. T., Asís, J. D., Tormos, J., Sabater-Muñoz, B. 2017. First field record and surveillance of *Aganaspis daci* on citrus fields affected by *Ceratitis capitata* in Spain.

Resumen: El eucoilino *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae) fue citado por primera vez en la Cuenca Mediterránea en el 2003, en la isla griega de Chios, exclusivamente sobre la mosca Mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) y en higos. Se trata de una especie de parasitoide de origen australasiático que se crió por primera vez en el centro Hawaiano del USDA-ARS, desde donde se ha exportado a varios países, incluyendo Israel y Egipto en 2009, con el fin de controlar dípteros de la familia Tephritidae. En España, sólo las especies *Spalangia cameroni* Perkins y *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) fueron identificadas como parasitoides nativos de *C. capitata*, sin registros de *A. daci*, durante un programa de búsqueda de parasitoides nativos que duró 5 años (2000–04). En el año 2003, se inició un proyecto de control biológico contra la mosca mediterránea de la fruta en la Comunidad Valenciana (Este de España), que incluyó la importación de varios parasitoides exóticos: *Fopius arisanus* (Sonan), *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) y *D. longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Durante el seguimiento de las liberaciones de estas especies (2007–2012), se recuperaron varios ejemplares de *A. daci* a partir de larvas de *C. capitata* recogidas en higos y cítricos. En el presente trabajo, los análisis filogenéticos de secuencias COI e ITS de estos especímenes españoles revelaron su pertenencia a esta especie, mediante su comparación con individuos de Grecia, Israel, Hawaii y Egipto y con ejemplares de las especies *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) y *Ganaspis xanthopoda* (Ashmead) (Hymenoptera: Figitidae) entre otros himenópteros. Además, se estableció un seguimiento anual de esta especie (por medio de manzanas cebo infestadas como trampas de atracción para parasitoides), que reveló una primera detección de *Aganaspis daci* a finales de junio, mostrando este parasitoide una distribución espacial que sigue el movimiento de la mosca mediterránea de la fruta desde cítricos hasta higos en la parcela seleccionada.

A version of this chapter has been submitted for publication:

de Pedro, L., Beitia, F., Falcó, J. V., Papadopoulos, N. T., Asís, J. D., Tormos, J., Sabater-Muñoz, B. 2017. First field record and surveillance of *Aganaspis daci* on citrus fields affected by *Ceratitis capitata* in Spain.

Abstract: The eucoilinae *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae) was first recorded in the Mediterranean basin in 2003, on the Greek island of Chios, restricted to medfly [*Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)] as host in fig fruits. From Australasia origin, it was first reared in the Hawaii USDA-ARS, from where it has been introduced into several countries, including Israel and Egypt in 2009, to control tephritid fruit flies. In Spain only the species *Spalangia cameroni* Perkins and *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) had been identified as native parasitoids of the medfly, with no records of *A. daci*, in the context of a 5 year-search program for native parasitoids (2000–04). Since 2003, a Biological Control project against the medfly was started in the Valencian Community (East coast, Spain) with the importation of several exotic parasitoids: *Fopius arisanus* (Sonan), *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) and *D. longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Following the release trials of these species (2007–12), several specimens of *A. daci* were recovered from medfly larvae collected from fig and citrus fruits. In this work, phylogenetic analysis of COI and ITS sequences of Spanish specimens revealed their assignation to this species by comparison to individuals from Greece, Israel, Hawaii and Egypt, and to species *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) and *Ganaspis xanthopoda* (Ashmead) (Hymenoptera: Figitidae). Furthermore, a year-round surveillance was established with infested sentinel apples as parasitoid attraction traps; *Aganaspis daci* was first detected late in June, with a spatial distribution following the medfly movement from citrus to fig fruits in the selected field plot.

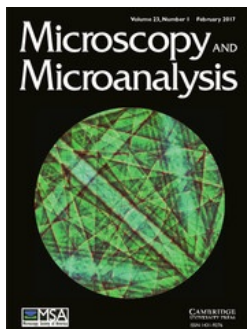
Keywords: Medfly, Parasitoid, Native, Biological Control Program.

CAPÍTULO 2

**“Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in
Aganaspis parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies”**

Desarrollo, fases preimaginales y equipamiento sensilar del imago en parasitoides de moscas de las frutas del género *Aganaspis* (Hymenoptera: Figitidae)

José Tormos, Luis de Pedro, Francisco Beitia, Beatriz Sabater-Muñoz, Josep Daniel Asís, Carlo Polidori



Microscopy and Microanalysis 19 (2013) 1475–1489

Factor de impacto (2013): 1.757

ISSN: 1431-9276 (Impreso), 1435-8115 (Online)

Resumen: *Aganaspis daci* y *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) son importantes parasitoides de moscas de las frutas. En este trabajo se estudiaron, mediante el uso de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, diversos aspectos de su morfología que podrían ayudar a planear su cría masiva y así contribuir a mejorar el control de plagas (fases preimaginales); y a arrojar luz sobre las relaciones parasitoide-plaga (equipamiento sensilar). Se ha visto que ambas especies presentan un huevo pedunculado; larvas de primer y segundo estado eucoiliformes; y larvas de tercer estado y madura de tipo himenopteriforme. El primer estado presenta diferenciaciones tegumentarias en el mesosoma y en el primer segmento metasómico en *A. daci*, pero no en *A. pelleranoi*, mientras que, a diferencia de otros figítidos, ninguna especie muestra setas en los procesos mesosómicos. La segunda y tercera fase larvaria, así como la larva madura, presentan diferenciaciones tegumentarias en *A. daci*, pero no en *A. pelleranoi*. Las antenas moniliformes (hembras) y filiformes (machos) de *A. daci* y *A. pelleranoi* albergan siete tipos de sensilas, cuatro de las cuales (sensilas campaniformes, sensilas celocónicas tipo II, y dos tipos de sensilas tricoideas) se describen en este trabajo por primera vez para la superfamilia Cynipoidea. Las sensilas más grandes eran las sensilas placoideas multiporosas, que eran más pequeñas y numerosas en *A. pelleranoi*. Ambas especies también diferían en cierta medida en la morfología de las sensilas celocónicas. A través de observaciones del ovipositor se reveló la presencia de sensilas celocónicas en la Valva I en ambas especies.

Development, Preimaginal Phases and Adult Sensillar Equipment in *Aganaspis* Parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of Fruit Flies

José Tormos,^{1,*} Luis de Pedro,¹ Francisco Beitia,² Beatriz Sabater,² Josep Daniel Asís,¹ and Carlo Polidori³

¹Unidad de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, 37071, Salamanca, Spain

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial. 46113-Montcada, Valencia, Spain

³Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), C/ José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid, Spain

Abstract: *Aganaspis daci* and *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) are important parasitoids of fruit flies. Here we studied, with light and scanning electron microscopy, aspects of their morphology that could help with plans to mass rear and thus contribute to improved pest control (preimaginal phases) and to shed light on parasitoid-pest relationships (sensillar equipment). The two species present a stalked egg, eucoiliform first and second-instar larvae and hymenopteriform third instar and mature larvae. The first instar presents tegumental differentiations in the mesoma and first metasomal segment in *A. daci*, but not in *A. pelleranoi*, while unlike other figitids, neither species displays setae in the mesosomal processes. Second and third instar and mature larvae present tegumental differentiations in *A. daci*, but not in *A. pelleranoi*. The moniliform (female) and filiform (male) antennae of *A. daci* and *A. pelleranoi* harbor seven types of sensilla, four of them (sensilla campaniformia, sensilla coeloconica type II, and two types of sensilla trichoidea) described here for the first time in Cynipoidea. The largest sensilla were the multiporous placoid sensilla, which were smaller and more numerous in *A. pelleranoi*. Species also differed to some extent in morphology of sensilla coeloconica. Observations on the ovipositor revealed the presence of coeloconic sensilla on Valva I in both species.

Key words: *Aganaspis daci*, *Aganaspis pelleranoi*, scanning electron microscopy, immature stages, flagellar sensilla, ovipositor sensilla.

1. Introduction

The genus *Aganaspis* Lin (Hymenoptera, Figitidae, Eucoilinae) comprises six species of parasitoids of tephritid flies (Díaz et al., 2006). Within Eucoilinae, the genus is unique in that it is the only one which has been successfully used in biological control of fruit flies (Clausen, 1978; Wharton et al., 1981; Baranowski et al., 1993). In particular, efficient fruit fly pest control has been recorded for *Aganaspis daci* (Weld) and *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes), two larvo–pupal solitary primary endoparasitoids. *A. daci* was first recorded in 1951 as a larval parasitoid of *Dacus* spp. in Malaysia and Taiwan (Weld, 1951). In the Mediterranean basin, it was first recorded in 2003, on the Greek island of Chios, and restricted to medflies [*Ceratitiscapitata* (Wiedemann)] as a host in fig fruits (Papadopoulos & Katsoyannos, 2003). Lately, it has spread to Israel and Egypt, from a USDA-ARS Hawaii colony (El-Heneidy & Ramadan, 2010). *A. pelleranoi* is a neotropical larval–pupal parasitoid, which attacks a wide variety of tephritid hosts, with distribution from México to Argentina (Ovruski et al., 2000) and was also recently reported in Spain.

In 2003, a biological control project was started with several imported exotic egg–larval parasitoids, *Fopius arisanus* (Sonan), *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) and *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), and following the release trials, several specimens of *A. daci* were recovered from medfly larvae collected from figs in the summer of 2009–2010, opening the way for a new program with a native larval parasitoid. At present, biological studies of this parasitoid are being performed to assess its adaptability to mass rearing. Previously, in Spain, only the species *Spalangia cameroni* (Perkins) and *Pachycrepoideus vindemniae* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) were identified as native pupal parasitoids of medflies, with no records of *A. daci* in a four-year survey (2000–04; Beitia et al., 2009).

For both *A. daci* and *A. pelleranoi* there is some information about certain aspects of their biology (Ovruski, 1994; Ovruski & Aluja, 2002; Guimaraes & Zucchi, 2004); however, little is known of certain aspects of their morphology that could contribute to planning mass-rearing and thus pest control [preimaginal phases, having only been studied in *A. pelleranoi* by Ovruski (1994) and briefly in *A. daci* by Clausen et al. (1965)] and to better understand parasitoid–pest relationships (sensillar equipment). In addition, little attention has been paid to its developmental biology (Papadopoulos & Katsoyannos, 2003; Andleeb et al., 2010) and functional morphology (but see Clausen et al., 1965). Developmental biology studies, including morphological characterization of the preimaginal stages, may be important in identification of an insect at the species level before adult emergence and can simplify quantification of the impact of natural enemies in biological control programs (Bellows & Van Driesche, 1999; Llácer et al., 2005; Onagbola & Fadamiro, 2007; Tormos et al., 2009a, 2009b). Morphological

studies of antennal and ovipositor sensilla (OS) can help to corroborate the role of antennal sensilla and OS in locating, evaluating and accepting the host (Jervis et al., 2005; Baaren et al., 2007).

Most knowledge about preimaginal morphology in Cynipoidea wasps is due to the contributions of Vårdal et al. (2003) and Nieves-Aldrey et al. (2004), as well as other studies by Clausen (1972) and Evans (1987). Scarce information exists for the genus *Aganaspis* (see above). On the other hand, although antennal and OS have been studied in some Figitidae taxa (Butterfield & Anderson, 1994; Lenteren et al., 2007), they have not been described in the genus *Aganaspis*.

2. Materials and methods

2.1. Insects

The stages of preimaginal phases, morphology of antennae and ovipositor, and data on the developmental biology of *A. daci* were obtained from rearing this parasitoid at the installations of Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA Valencia, Spain), in a climate chamber (Sanyo MLR350) at 25 ± 0.2 °C, $65 \pm 10\%$ RH, and a 16L:8D photoperiod. For rearing, third-instar larvae of the Mediterranean fruit fly were used as hosts, and parasitoids, confined in a plastic cage (35 x 30 x 36 cm) with ventilation, were fed with honey impregnated on strips of blotting paper, sugar, and water.

The morphology of antennae and ovipositors of *A. pelleranoi* were analyzed in eight specimens obtained from a collection from México. Preimaginal phases of this species were not studied here because a detailed description is already given in Ovruski (1994). This description is used for comparison with our results for *A. daci*.

To study development and morphology of the immature stages, 2000 third-instar larvae of *C. capitata*, which had been exposed to *A. daci* for 4 h, were taken from a plastic rearing cage where large numbers of *A. daci* females and males had cohabited for a number of generations. Fifty larvae per plate were placed in 40 Petri dishes (9 x 1.5 cm). One hundred parasitized larvae and pupae per day were periodically dissected in Insect Ringer's solution on depression slides in order to examine development and morphology of the different phases. Additionally, in order to determine the time each of the sexes took to develop, 1000 third-instar larvae previously exposed to parasitoids were allowed to develop in order to obtain *A. daci* males and females.

One hundred and twenty-five eggs, 220 immature larvae, 36 mature larvae, and 78 pupae of *A. daci* were fixed and preserved in 70% EtOH for subsequent study and description.

Descriptions are based on several specimens. The length of the egg and first-instar larval body was measured from the posterior tip to the transition between body and peduncle. The length of the first- and second-instar larva body was measured from the anterior tip to the transition between the body and the peduncle. The length of the mandibles is the maximum length: measured from the points of articulation with the head to the pointed tip. The ensuing descriptions essentially employ the terminology and organization used by Tormos et al. (2009a, 2009b). Data are presented as range and mean values \pm standard deviation (SD). Student's *t*-tests to determine inter-sexual differences were performed using the SPSS statistical software package (v15.0).

Immature phases studied are deposited at the IVIA. Adults are deposited at the Museo Nacional de Ciencias Naturales (Madrid, Spain).

2.2. Histological methods, stereomicroscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM)

2.2.1. Preimaginal stages

For light microscopy preparation of eggs and larval stages, the methods described by Tormos et al. (2003, 2004, 2007, 2009a, 2009b) were employed, with the exception of first-instar larvae for which the method used by Roskam (1982) to prepare Eurytomidae larvae was followed. In this case the larvae were macerated in warm 80% lactic acid and then washed in 30% ethanol, with fatty substances removed in acetone before dehydration and preparation. Photos and measurements to the nearest 0.01 mm of different structures of the preimaginal phases were taken under a Leica MI65C microscope, equipped with a Leica EC3 camera using the Application Suite Version 3.6.O (Imaging Software Integrates, Leica Microsystems Imaging Solutions) (IVIA).

Sketches were made with a drawing tube and subsequently using the Adobe Illustrator CS5 application to create and manipulate the vector drawing. For SEM, live samples were frozen in slush N₂ and attached to the specimen holder of a CT-1000C Cryo-transfer system (Oxford Instruments, Oxford, UK) interfaced with a JEOL JSM-5410 SEM (Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain). Samples were then transferred from the cryostage to the microscope sample stage, where the condensed surface water was sublimed by controlled warming to -90° C. Then, samples were transferred again to the cryostage and sputter-coated with gold. Finally, the samples were returned to the microscope sample stages for visualization at an accelerating voltage of 15 keV.

2.2.2. Sensilla of antennae and ovipositors

The antennae of three females and three males of both species were analyzed while the ovipositor was studied in two females of both species. The sensilla on antennae and ovipositors were studied by analyzing SEM images obtained using an ESEM QUANTA 200 microscope (FEI Company, Oregon, USA) at the Museo Nacional de Ciencias Naturales (Madrid, Spain). High vacuum conditions [resolution: 3.0 nm at 30 kV (SE), 10 nm at 3 kV (SE), and 4.0 nm at 30 kV (BSE)] were used on gold-coated samples. The accelerating voltage was 26 kV, the high vacuum was 0.40–0.50 torr, and the working distance was 10 mm. Antennae and ovipositors were observed in dorsal, ventral and lateral view.

For the sensilla inventory, we primarily followed the classification of sensilla by Callahan (1975), Isidoro et al. (1996), Keil (1999) and Romani et al. (2010a), based on morphological characters. This classification should be considered, for some sensilla types, as preliminary because the internal structure and function of different types of sensilla are not yet fully known (Altner, 1977). The flagellomeres were designated F1 to F11 for females and F1 to F13 for males, in a proximal to distal direction.

The antennae were observed in dorsal, ventral and lateral views. The number of sensilla was not recorded exactly on each segment due to orientations of some twisted antenna. However, we counted them in certain well-visible segments. The sample of sensilla used for size calculations came from two or three antennae from each species, depending on their visibility/definition in the SEM images. Because of the small sample size (number of individuals and antennae), we give numerical results as ranges rather than means.

In both cases, for the preimaginal phases as well as for the morphological analysis of antennae and ovipositors, we calculated lengths and widths of structures and body parts from pictures taken at higher magnifications (up to 300×), importing them into ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), where calculations were made.

3. Results

3.1. Development of *A. daci*

The *A. daci* life cycle can be divided into four phases: egg (embryonic), larval, pupal, and adult (Table 1). At 25 °C, the life cycle takes ~ 32–33 days to complete. Development time (32.08 ± 2.54 days in females and 28.23 ± 2.52 days in males) differed significantly between the two sexes (Student's *t*-test, *F*-test for equal variance: $F = 0.986, \leq 0.100$; $df = 624, t = 7.784, p < 0.001$), being greater for the female. The mating period started after adult emergence. The embryonic phase of *A. daci* (0–82 h) begins with the injection of an egg into a third-instar host

larva. The embryo hatches into the first-instar endoparasitic eucoiliform larva (80–120 h). The first-instar molts into a still “endoparasitoid” hymenopteriform second instar (around ~ 108 h). The second-instar molts into a third-instar larva, which emerges from the host body cavity, marking the endo to ectoparasitic transition. This larva occupies both internal and external positions in the host pupa and develops two respiratory mechanisms, like *A. pelleranoi* (Ovruski, 1994), one cuticular, and another tracheal. During this “ectoparasitic phase” (~ 100 h), this instar larva feeds externally within the host puparium. The third-instar larva molts into a fourth-instar larva (mature larva) whose feeding continues externally on what remains of the host pupa and is very sluggish, occupying the greater part of the puparium host (~ 140 h). After feeding is completed, host remains (meconium) are excreted, and the fourth-instar larva decreases in size and becomes a prepupa (postdefecating mature larva). The prepupa gives rise to the pupa (~ 220 h), which is characterized by a halt in growth and rapid differentiation. The adult phase begins with the emergence of free-living adult male (~ 672 h) and female (~ 770 h) wasps.

3.2. Preimaginal stages of *A. daci*

3.2.1. Egg

The embryonic phase of the life cycle of *A. daci* begins with the injection of one or more eggs into the hemocoel of the last instar of a *C. capitata* larva. Approximately similar in size to the *A. pelleranoi* egg (Ovruski 1994; Table 1), the *A. daci* egg also presents a stalk on the anterior end and, like the *A. pelleranoi* egg, is surrounded by a thin, translucent, and smooth chorion (Fig. 1A), the embryo, vitelline membrane and chorion becoming discernible at 24 h after oviposition (Fig. 1B). At 48 h after oviposition, the stalk has practically disappeared (Fig. 1C) and after 72 h the embryo shows signs of body segmentation (Fig. 1D). SEM observation of this last stage (Fig. 1E) shows that the chorion surface lacks apparent sculpturing, but a specialized area with a softer chorion can be seen at the anterior end of the egg (Fig. 1F). In all cases ($n = 25$) the eggs hatched at between 80 and 82 h after oviposition at 25 ± 0.2 °C, $65 \pm 10\%$ RH, and a 16L:8D photoperiod.

Table 1. Measurements taken on the different phases of development of *Aganaspis daci*.*

Phase	Variable	Measurement (mm)**
Egg	Length	0.51 ± 0.004 [0.48–0.66] (<i>n</i> = 125)
	Maximum width	0.29 ± 0.03 [0.28–0.32] (<i>n</i> = 125)
Larva, first instar	Body length	0.91 ± 0.05 [0.87–1.17] (<i>n</i> = 80)
	Body width at the level of the metathoracic segment	0.21 ± 0.04 [0.18–0.23] (<i>n</i> = 82)
Larva, second instar	Body length	1.06 ± 0.03 [1.09–1.12] (<i>n</i> = 14)
	Body width at the level of the metathoracic segment	0.25 ± 0.03 [0.22– 0.27] (<i>n</i> = 15)
Larva, third instar	Body length	2.65 ± 0.03 [2.50–2.79] (<i>n</i> = 26)
	Body width at the level of the metathoracic segment	0.68 ± 0.05 [0.62– 0.74] (<i>n</i> = 31)
Larva, fourth instar	Body length	2.81 ± 0.02 [2.95–3.04] (<i>n</i> = 12)
	Body width at the level of the metathoracic segment	1.16 ± 0.03 [1.04–1.22] (<i>n</i> = 25)
	Cranium maximum width	0.57 ± 0.06 [0.53–0.57] (<i>n</i> = 26)
	Mandible length	40.63 ± 0.48 [31.25–51.22] (<i>n</i> = 12)
	Prepupa length	2.11 ± 0.09 [2.01– 2.13] (<i>n</i> = 7)
	Prepupa width	0.95 ± 0.10 [0.93– 0.99] (<i>n</i> = 7)
	Pupa length	1.82 ± 0.31 [1.6–2.00] (<i>n</i> = 57)

*Mean values ± SD, minimum-maximum range (in square brackets) and sample size (in brackets) are reported. All measures are in mm.

**Except in the mandibles that are in μm .

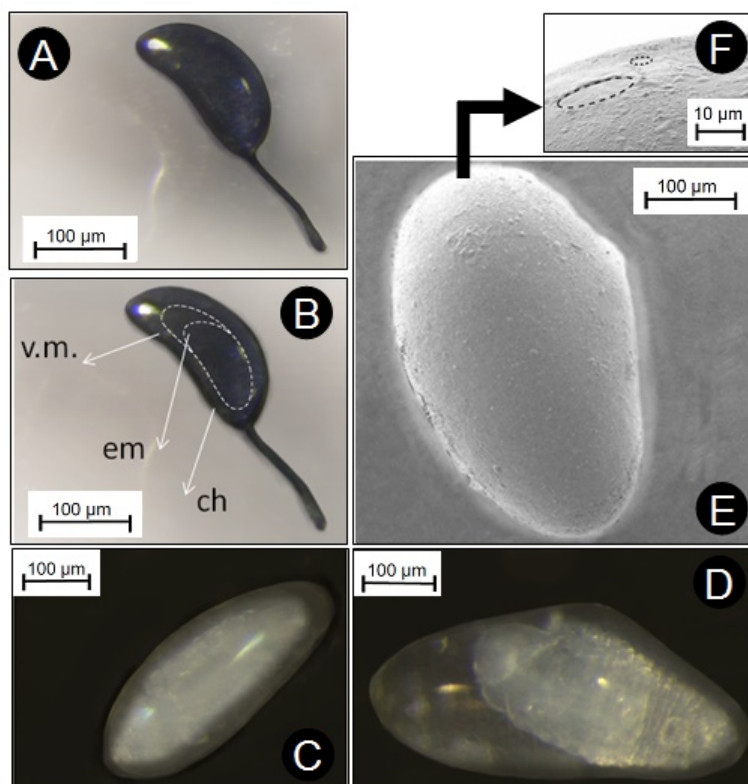


Figure 1. *Aganaspis daci* (Weld). Egg: (A, B) eggs at 24 h after oviposition; (C, D) eggs between 48 h (C) and 72 h (D) after oviposition [the dotted lines show the vitelline membrane (v.m.) and outline the embryo (em); an arrow shows the chorion (ch)]; (E, F): SEM pictures show eggs to have a smooth surface (E) and specialized anterior area with the chorion distinctly softer (F, see circles with dotted line).

3.2.2. Larva, First instar

First-instar larvae were eucoiliform (thoracic segments bear a pair of long ventral processes; posterior abdominal segments taper into a fleshy caudal region) type. This stage was observed between 80 h and the 5th day after oviposition when the host was in early pupa stage. General aspects and measurements are shown in Figures 2A, 2B, 2F and Table 1. Color is whitish and more or less translucent. Shape is subcylindrical with a defined and elongate head and 11 body segments. The cranium (Figs. 2A, 2B) is elongated with a prominent more or less tubular anteroventral “proboscis” (Figs. 2C, 2D) that has a large number of concavities – presumably sensory structures– and on whose apex the mouth is located, surrounded by several oral papillae. Inside the mouth there are the falcate mandibles (unidentate and more or less subtriangular). The gut is easily discernible. The head has at least 14 pairs of sensory structures. A pair of appendages (Figs. 2A, 2B, 2E), each measuring approximately half the body length (without tail), is present on each one of the three thoracic segments. A long spiny tail, measuring approximately two-thirds of the body length, and a short ventral process (Figs. 2F, 2G, 2H) emerges from the caudal segment. The lateral and ventral margin of the seventh

abdominal segment and basal end of the caudal segment have scale-like ornamentation (Fig. 2H). The integument of the mesosoma and first abdominal segment have numerous differentiations (Fig. 2E). The anus (Fig. 2G, see arrow) opens dorsally in the last abdominal segment. At the end of this period, the larvae lose all thoracic appendages and ventral processes.

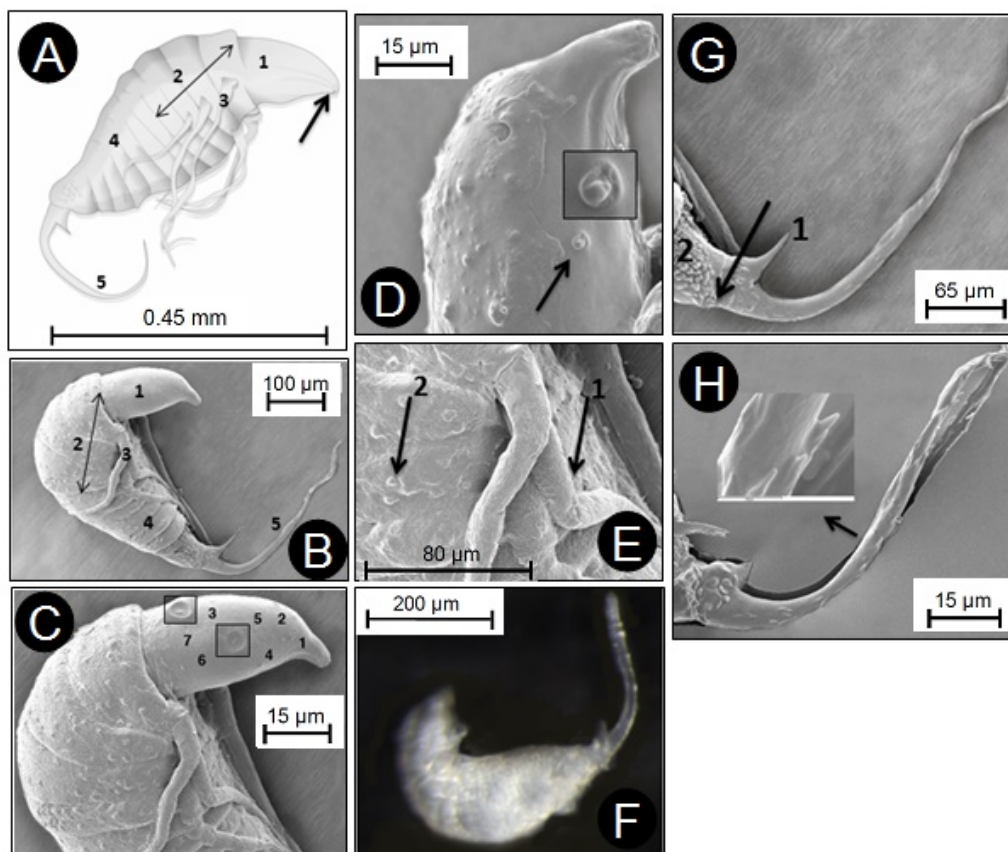


Figure 2. *Aganaspis daci* (Weld). Larval phase. First instar: (A, B) (under SEM): body showing the head (1), mesosoma (2) with long slender ventral thoracic processes (3), metasoma (4) and the caudal tail (5) [in (A), an arrow points to the mandibles]; (C) detail of the head showing presumed sensory structures of different types (numbers 1–7, see detail 3, 5 x 2.5); (D) detail of the head showing the “proboscis” and several tegumental differentiations of likely sensory value (an arrow points to a probable sensory structure, detail x 2.5); (E) detail of thoracic processes (see arrow 1) and tegumental differentiations (see arrow 2) present in mesosoma and first abdominal segment; (F–H) details of caudal segment showing tail with spines [(H) (under SEM), see arrow, detail x 2.5], ventral process [(G)–(1)], scale-like ornamentation on caudal segment [(G)–(2)], and anus position [(G) (under SEM), see arrow].

3.2.3. Larva, Second Instar

The second-instar larva is modified eucoiliform (without thoracic appendages and caudal segment with a very short tail). This stage was observed between the 5th and 10th day after oviposition, when the host was in the pupa phase. It appears to last around 108 h. General aspects and measurements are given in Figures 3A–3C and Table 1. The body is more or less translucent, whitish or yellowish with a discernible gut (Fig. 3A) and wave-like segmentation on both ventral and dorsal sides and with some white globular fat particles; subcylindrical in shape, with a short and fleshy head; mouth with external oral papillae (Fig. 3C, see arrow); unidentate mandibles, with slightly sclerotized apices and slightly protuberant labial palpi; caudal segment with very short tail (Fig. 3B); anus opening dorsally, seen as an indentation in the contour of the posterior dorsal side (Fig. 3A).

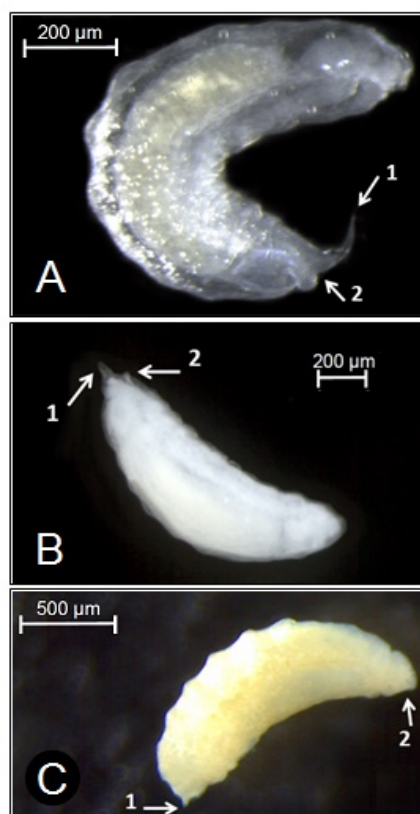


Figure 3. *Aganaspis daci* (Weld). Larval phase. Second instar: (A–C) body in lateral view showing the short tail [see arrow 1 in (A–C)], anus [see arrow 2 in (A)], oral papilla [see arrow 2 in (C)], and reminiscence of the ventral process [see arrow 2 in (B)].

3.2.4. Larva, Third Instar

The third-instar larva is hymenopteriform. This stage was found between the ninth and 14th day after oviposition. It appears to last around 100 h. General aspects and measurements are given in Figures 4A–4D and Table 1. The body is yellowish with white fat globules in the mesosoma and metasoma (Fig. 4A); subcylindrical in shape, with broad head (Figs. 4B, 4C). Spiracles (Figs. 4B, 4D) are apparent on the first metasomal segment; atrium with asperities. Dorso-laterally each segment bears one pair of tegumental differentiations (one sensorial structure on each side; Fig. 4C'). The anus terminal is in a central position as a transverse slit (Fig. 4A). Mouthparts with small and unidentate mandibles are apparent (Figs. 4B, 4D).

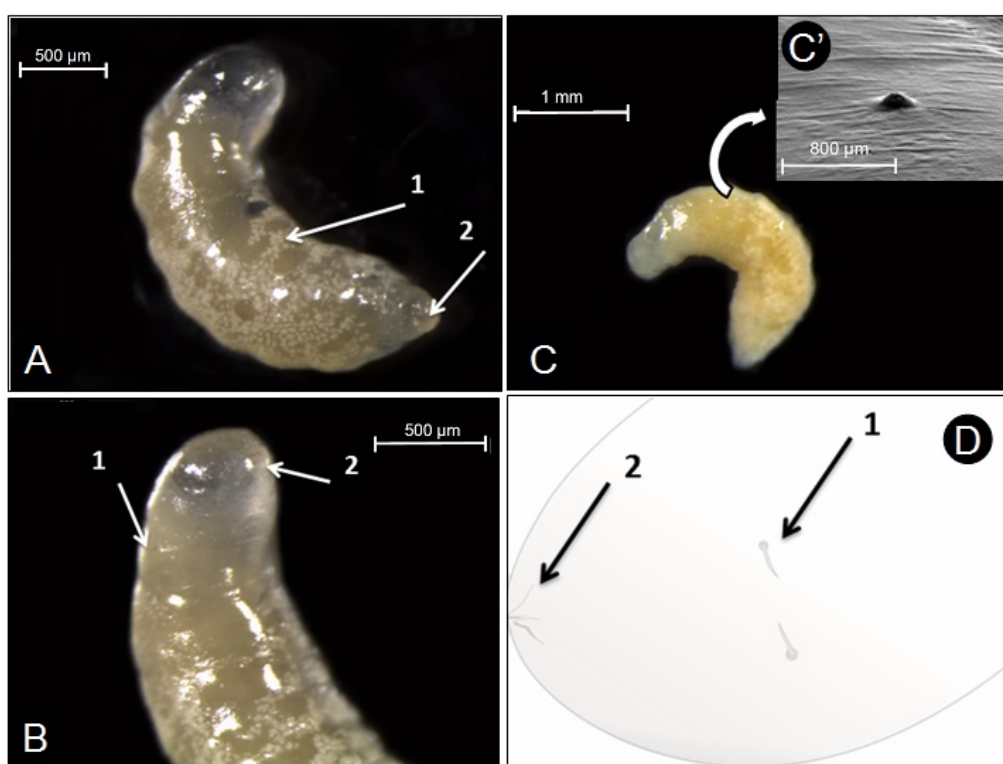


Figure 4. *Aganaspis daci* (Weld). Larval phase. Third instar: (A, C) body in lateral view showing the fat globules in mesosoma and metasoma (see arrow 1) and the anus (see arrow 2), and tegumental differentiations [(C, C') shows a detail under SEM]. B: Anterior part of body in lateroventral view showing the spiracles [see arrow 1, detail in (D) where it is possible to see the asperities of the atrium] and mandibles [see arrow 2, detail in (D)].

3.2.5. Larva, Fourth Instar

The mature larva is like the previous instar hymenopteriform type. This stage was found between the 15th and 21st day after oviposition. It appears to live around 140 h. General aspects and measurements are shown in Figures 5A–5C and Table 1. The body is whitish with small white fat globules present in the metasoma and whose stomach content is easily discernible (Fig. 5B). The shape is subcylindrical with well-developed pleural lobes (Fig. 5C). The terminal anus is a transverse slit (Fig. 5C). In this instar, it is possible to observe the configuration of the cephalic sclerites on the head capsule (Fig. 5E), that show a marked difference with the previous instar, and several sensory structures (Fig. 5E). On both sides of the dorsolateral region of the prothorax there is a tiny seta (Fig. 5A). There are also several tegumental differentiations, most probably having a sensory function, that are either scattered (Fig. 5F) or arranged in rows or clusters on the tegument of the mesoma and metasoma. The spiracles (Fig. 5D) are present on all body segments, except the prothorax and last metasomal segment above the pleural lobes (Fig. 5C) and walls of the atrium with asperities (Fig. 5A). The cranium (Figs. 5A–C, 5E) has two papilliform antennae with one apical sensillum (Fig. 5E). The epistoma and labrum are distinct, sclerotized, with sensory structures (Figs. 5E, 6C, 6C'). The labral sclerite is emarginated (Fig. 5E). The mandibles (Figs. 6A, 6B) have two sharp well sclerotized apical teeth. The maxillae and labium (Figs. 6A, 6C, 6D) have distinguishable sensory structures that could correspond to labial palpi, maxillary palpi and sensilla arranged behind labial palpi (Figs. 6C, 6D). A reduction was observed in the size of the predefecating mature larva to the prepupa (postdefecating mature larva; Fig. 6E), probably due to expulsion of the meconium.

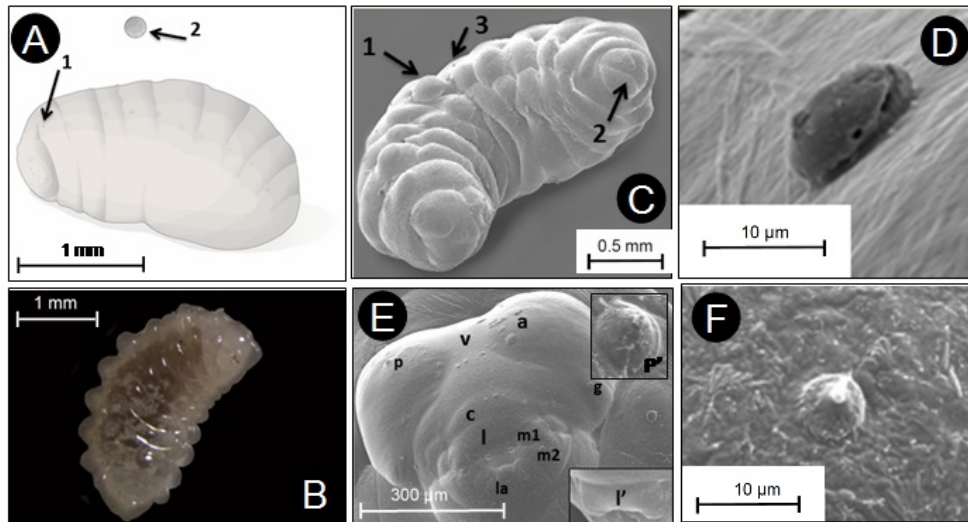


Figure 5. *Aganaspis daci* (Weld). Larval phase. Fourth instar: (A–C) body in lateral view showing the head and fat globules and stomach content (B), pleural lobes (see arrow 1), anus (see arrow 2), and location of the spiracles (see arrow 3) [(C) (under SEM); (D) (under SEM)] shows the prothoracic spiracle in detail, setae on the prothorax [see arrow 1, (F) showing a detail] and detailed view of the spiracles (atrium with asperities, see arrow 2) (A). E: (under SEM): cranium showing the vertex (v), antennal areas (a) with antennal papillae (p), cephalic sclerites [clypeus (c), labrum (l, l')] mouthparts (m1 = mandibles, m2 = maxilas; la = labium), sensory structures [e.g., gena setae (g)], and detail of antennal apical sensillum (p').

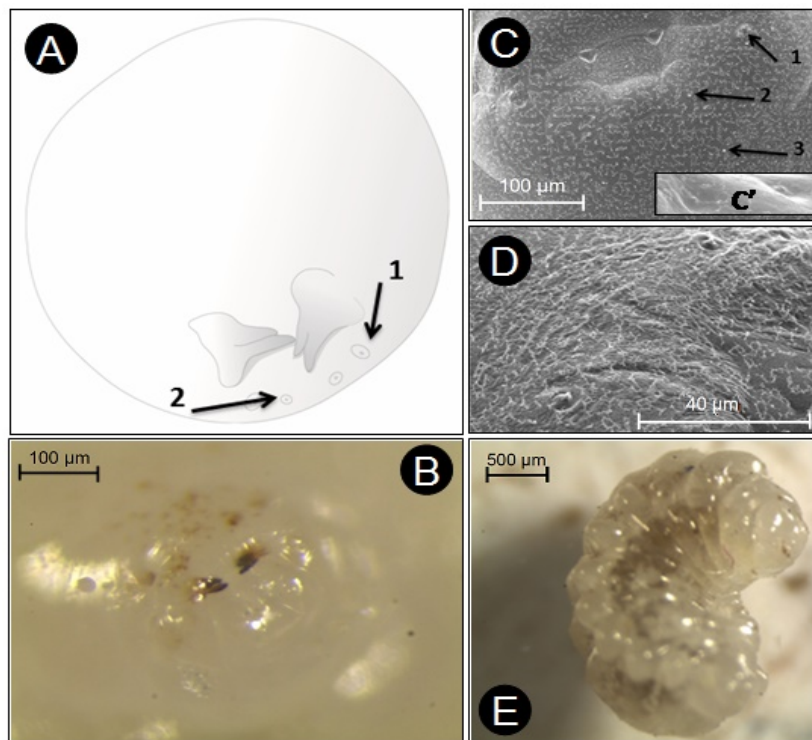


Figure 6. *Aganaspis daci* (Weld). Larval phase. Fourth instar: (A, B) mouthparts: mandibles, maxillary, and labial palpi [see arrow 1, 2 in (A, C)] and sensilla behind labial palpi [see arrow 3 in (C) and detail in (D)]. C': Detail of the sensilla of the labrum. E: mature larva expelling the meconium.

3.2.6. Pupa

General aspects are presented in Figures 7A, 7B, and Table 1. The body is naked, adecticous, and exarate. Initially, this immature stage is white but later pigmentation begins to appear until the dark adult coloring is reached. The most outstanding character of this phase lies in the presence of protuberances on the metasoma (Fig. 7B); by contrast, the corresponding area on the larval or adult metasoma is bare. The adults use their mandibles to chew a small irregular circular emergence hole (Figs. 7C, 7D) through the puparial wall. This instar lasts for 9 days. The males emerge in 4–7 days and the females in 7–9 days.

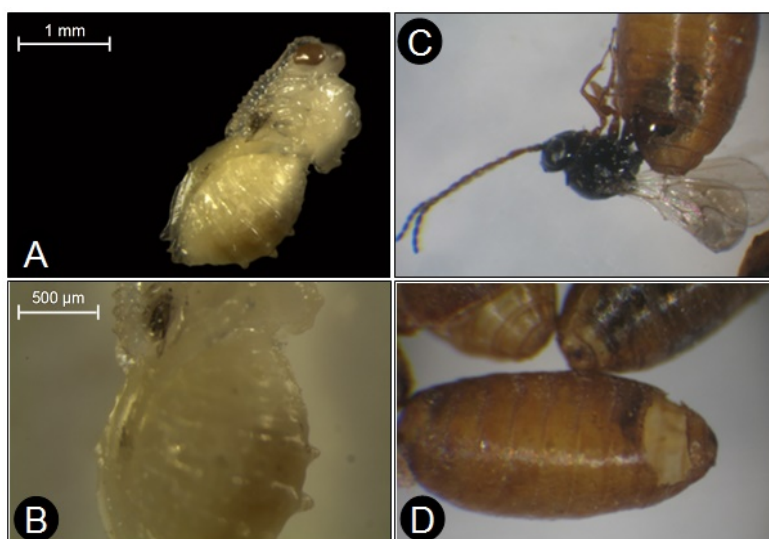


Figure 7. *Aganaspis daci* (Weld). Pupal and adult phase: Pupa: (A, B) body in lateral view, (B) shows the dorso-lateral metasomal protuberances in detail. Adult: (C) adult emerging from a *C. capitata* pupa. D: Puparium with an emergence hole.

3.3. Sensillar equipment on antennae and ovipositor

3.3.1. Antennae

In both species, female antennae are cylindrical and consist of 13 segments: a scape, a pedicel, and a flagellum consisting of 11 flagellomeres (Figs. 8A, 8D). In males of both species, 13 flagellomeres are present, so the antennae, also cylindrical, are composed of 15 segments (Figs. 9A, 9D). *A. pelleranoi* is larger than *A. daci*, and so has longer antennae (Table 2). Male/female ratio of antenna length is similar in both species (Table 2). Female antennae belong to the moniliform type (i.e., like a string of beads), while male antennae belong to the filiform type (i.e., linear and slender) (Figs. 8A, 8D, 9A, 9D). Neither female nor male antennae present a distally distinct club (i.e., a greatly enlarged apical flagellomer or flagellomeres of an antenna; Figs. 8B, 8E, 9B, 9E); however, in females, the apical segment (F11) is slightly longer than the next one (F10) (F11/F10 ratio similar in both species; Figs. 8A, 8D; Table 2); this does not

occur in males (Figs. 9A, 9D; Table 2). The flagellomeres in female moniliform antennae are distinctly separated by a narrow neck-like articulation, which is wider (i.e., placing segments further apart from one another) in *A. daci* than in *A. pelleranoi* (the width is similar but the antennae of *A. daci* are smaller) (Figs. 8A, 8D, 8C, 8F; Table 2). F1 in males of both species are swollen and excavated ventro-laterally. This modification, named “release and spread structure” (RSS; Isidoro et al., 1996), consists of a ridge and an excavation (Figs. 9C, 9F), both of which are perforated with pores (Fig. 10D). The length of RSS is similar in both species (Table 2), and covered most of F1, which is of similar length despite the overall inter-specific difference in antenna length (i.e., RSS is relatively longer in *A. daci*). Pores of RSS are similar in size in the two species, although they are much more visible in *A. daci* under SEM.

Sensilla found on the antennae protrude from the cuticle or sometimes lie within or beneath it. We recognized seven types of sensilla in both species: sensilla placoidea (SP), sensilla coeloconica type I (SCo-I), sensilla coeloconica type II (SCo-II), sensilla campaniformia (SCa), sensilla trichoidea type I (ST-I), sensilla trichoidea type II (ST-II) and sensilla trichoidea type III (ST-III). All types of sensilla were found in both sexes, except ST-II and ST-III, which were only found in males. The description of each sensilla type is given below.

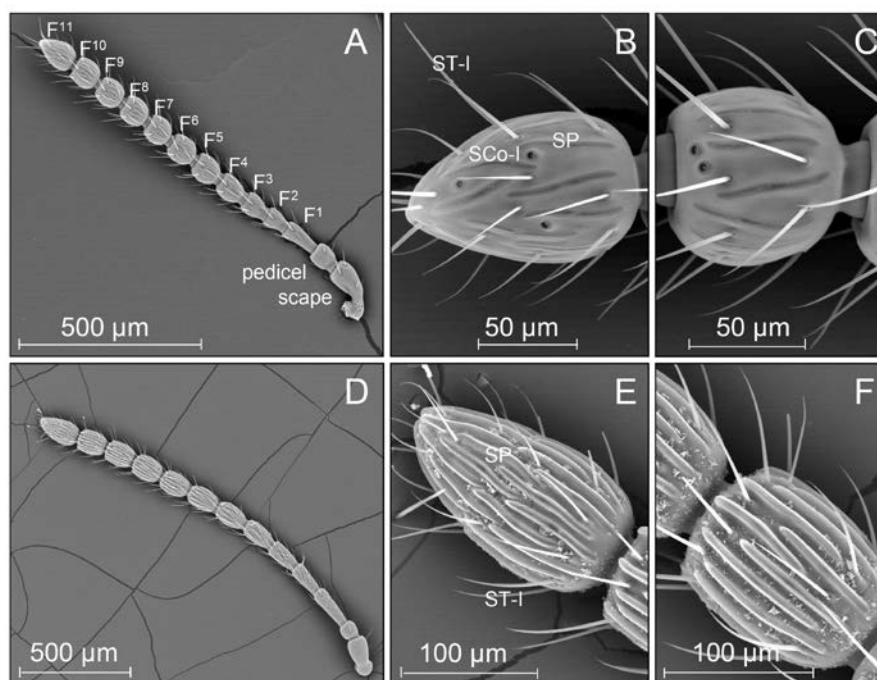


Figure 8. General aspect of the female antenna [(A, D) both in dorsal view] of *Aganaspis* spp., and of its F11 [(B) ventral view; (E) dorsal view] and F9 [(C) ventral view, (F) dorsal view]. A–C: *A. daci*; D–F: *A. pelleranoi*. SP, sensilla placoidea; SCo-I, sensilla coeloconica-type I; ST-I, sensilla trichoidea-type I.

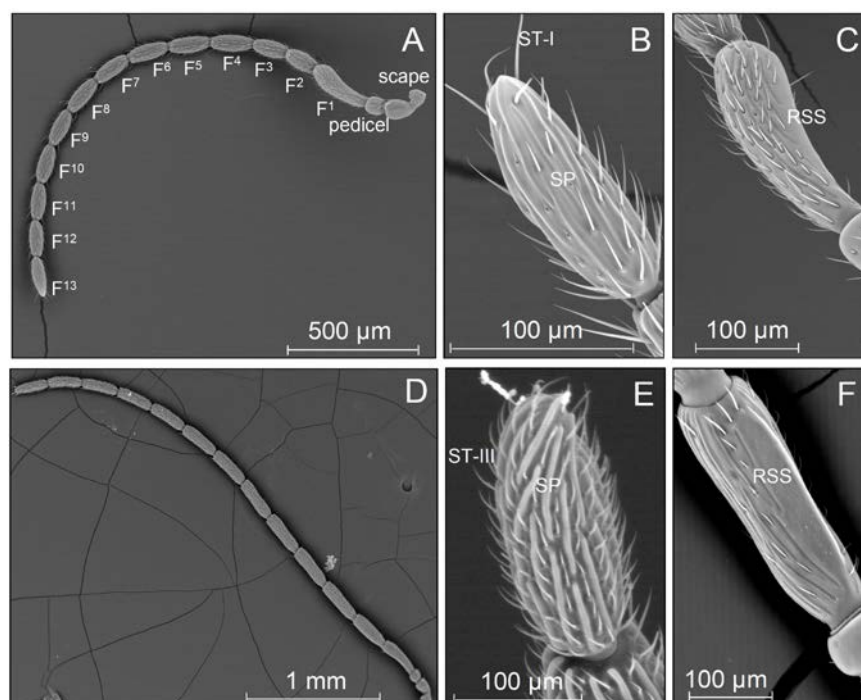


Figure 9. General aspect of the male antenna [(A, D) both in lateral view] of *Aganaspis* spp., and of its F13 [(B) lateral view; (E) dorsal view] and F1 [(C) lateral view; (F) ventral view]. A–C: *A. daci*; D–F: *A. pelleranoi*. SP, sensilla placoidea; ST-I, sensilla trichoidea-type I; ST-III, sensilla trichoidea-type III; RSS, release and spread structure.

Table 2. Measurements taken on the antennae and antennal sensilla of *Aganaspis daci* and *Aganaspis pelleranoi*. All measures are in μm .

Variable	<i>A. daci</i>	<i>A. pelleranoi</i>
Antenna length	Females: 900–1000, males: 2000–2100	Females: 1800–2000, males: 3900–4000
Male/female ratio of antenna length	2	2
Length of apical segment (F11 for females and F13 for males)	Females: 110–114, males: 150–155	Females: 174–179, males: 258–270
Length of F10 (females) or F12 (males)	Females: 75–78, males: 140–150	Females: 120–129, males: 262–280
F11/F10 ratio (females)	1.5	1.5
F13/F12 ratio (males)	1	1
Width of the narrow neck-like articulation between flagellomeres of female antenna	15–18	15–18
Release and spread structure (RSS) in male antenna	220–240	220–240
Length of F1 in males	280–300	270–290
Area of RSS pores	1	1
SP length / flagellomer length	0.66–1	0.66–1
SP length	Females: 30–70, males: 70–90	Females: 60–100, males: 60–110
SP width	Females: 4–5, males: 4–6	Females: 6–8, males: 4–5
SCo-I peg diameter	1	1.5
SCo-II peg diameter	2	2
Diameter of the SCo-I “collared” pit from which the peg protrudes	3–4	3–4
SCa button-like nov diameter	0.5	0.5
ST-I length	Females: 50–60, males: 30–50	Females: 50–80, males: 30–50
ST-I width at the half length	2	2
ST-II length	20–50	20–50
ST-II width (at the half length)	1.5	1.5
ST-III length	15–30	15–30
ST-III width (at the half length)	2	2

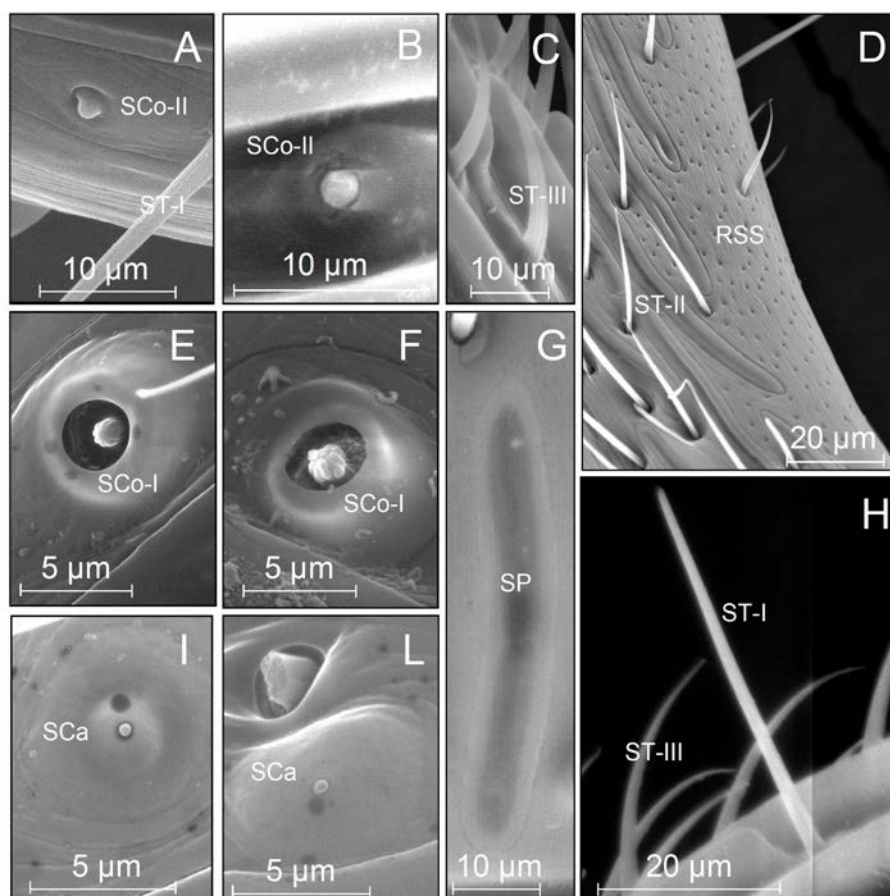


Figure 10. Different sensilla types found on the antennae of *Aganaspis* spp. **A, E, G, I:** *A. daci* female; **(F)** *A. pelleranoi* female; **(D, L)** *A. daci* male; **(B, C, H)** *A. pelleranoi* male. SP, sensilla placoidea; SCo-I, sensilla coeloconica-type I; SCo-II, sensilla coeloconica-type II; ST-I, sensilla trichoidea-type I; Sca, sensilla campaniformia; ST-I, sensilla trichoidea-type I; ST-II, sensilla trichoidea-type II; ST-III, sensilla trichoidea-type III; RSS, release and spread structure.

3.3.1.1. SP

The SP are the largest and the most conspicuous sensilla on the antennae of both sexes and species (Figs. 8B–8F, 9B–9F). They are multiporous, elongate, plate-like sensilla with a large surface area arising from the cuticle (*A. pelleranoi*) or almost lying flat against it (*A. daci*), and they are surrounded by a grooved gap (Figs. 8, 9, 10G). In both species, SP covers a large part of a flagellomer, and its length and width varies with species and sex, being overall larger in *A. pelleranoi* females (Figs. 8, 9; Table 2). SP occur on all flagellomeres both dorsally and ventrally, are aligned parallel to the antennal axis (Figs. 8, 9), and their number in each flagellomer (counted on dorsal side) is higher in *A. pelleranoi* (females: seven to nine, males: 20–30) than in *A. daci* (females: four to seven, males: seven to nine). In addition, in both sexes of *A. pelleranoi* SP is elevated more from a cuticular base of the flagellomer when compared to the flatter structure found in *A. daci*.

3.3.1.2. Sensilla Coeloconica

This type of poreless sensilla is of two distinct types. In the SCo-I the cuticular peg stands on the antennal surface and presents a “collar” of wrinkled cuticle surrounding the peg, which is set in a distinct cuticular depression (Figs. 10 E, 10F). Meanwhile in SCo-II, the peg is almost completely embedded within the antennal wall, communicating with the external environment only through a narrow opening (Figs. 10 A, 10B). The two types also differ in peg shape, this being very bulbous in SCo-I, with the stalk of the peg giving rise to finger-like projections joining at the tip (Fig. 10 E, 10F), and with a simpler, unsulcated structure in SCo-II (Figs. 10A, 10B). Coeloconic sensilla are located ventrally, sometimes laterally, and are present in relatively low numbers in the antennae, and in particular SCo-II were found to be extremely rare, present only on F7–F11. On rare occasions, SCo-II were found in clusters of four to six on a single flagellomer. SCo-I were observed to have a more defined distribution on the antennal segments, being present in pairs or triplets (much more rarely in groups of four) from F2 to F11, generally distally, in both sexes and species. The shape of the SCo-I and SCo-II seems to differ between species: in particular in *A. daci* the peg of SCo-I is a bit smaller and the bulbous structure seems to be more organized and less “inflated” than in *A. pelleranoi* (Figs. 10A, 10B, 10E, 10F; Table 2).

3.3.1.3. SCa

SCa are characterized by a button-like knob with an irregular surface emerging from an opening in the center of a quite flattened, or slightly raised smooth circular cuticular disk (Figs. 10I, 10L; Table 2). They are located ventrally and are quite rare along the antenna, with just one sensillum per flagellomer (sometimes they were lacking), from F2 to F11 in both sexes and species, and often close to the SCo-I.

3.3.1.4. Sensilla Trichoidea

We found three different types of trichoid sensilla. All were observed to be long sensilla ending in a fine, sharp tip. They were abundant on all flagellomeres both ventrally and dorsally. ST-I was the only type we found in females, while all types were found in males. ST-I were the longest trichoid sensilla (Figs. 8, 9, 10A, 10H; Table 2), they can be either curved or not, and have longitudinal grooves. The longest and less curved ones were especially found laterally on the distal part of the flagellomeres, sometimes in a pair of two sensilla located at opposite positions along the segment width (Figs. 8, 9). ST-II are a bit shorter than ST-I, a bit more curved, thinner than ST-I, and they have less pronounced longitudinal grooves (Fig. 10D; Table 2). These sensilla are typically the only type found around the RSS on F1 (Fig. 10D). ST-III were the shortest trichoid sensilla, more curved than the other types, quite thick, and with deep

longitudinal grooves (Figs. 10C, 10H; Table 2). This sensilla type appeared to be much more abundant in *A. pelleranoi* than in *A. daci* (Figs. 9B, 9E).

3.3.2. Ovipositor

As in other hymenopteran parasitoids, the ovipositor of *Aganaspis* spp. consists of paired (Valva I) and unpaired valves (Valva II) (Fig. 11A). The paired valves articulate with the unpaired valve through a tongue-and-groove arrangement. In addition to the sensilla and some barbs present on the tip of the paired lower valves, a particular structure, the ovipositor clip (OC), is observed on the unpaired valve near the tip of the ovipositor at about 130–150 μm from the tip (Fig. 11D).

Sense organs were found on Valva I. These sensilla (OS) resemble coeloconic sensilla of type II (SCo-II) (Figs. 11B, 11C). The peg is about 1 μm in diameter and about 0.5 μm long. They are found distributed along the distal half of Valva I, having a characteristic arrangement with three pairs about 10 μm apart and with two sensilla in a pair at a distance of about 5 μm apart (Fig. 11B).

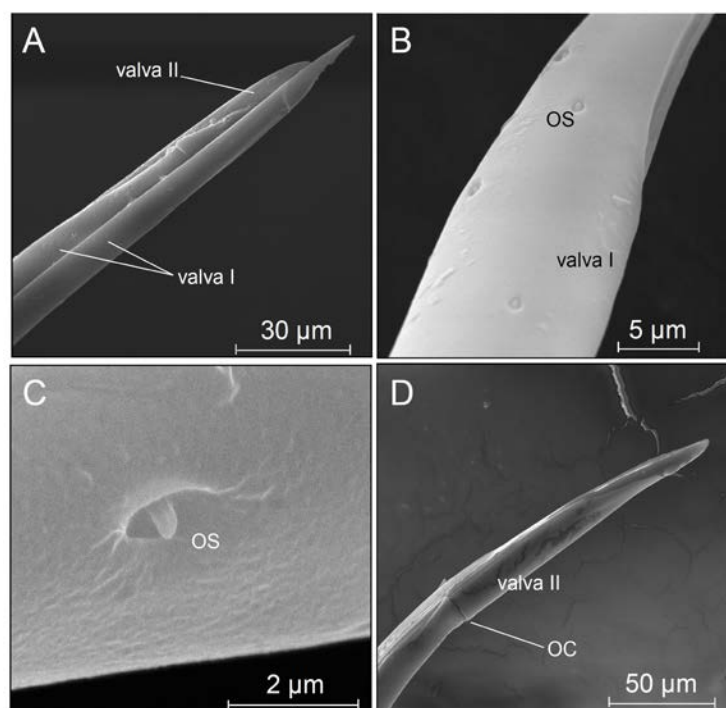


Figure 11. Ovipositor morphological features and ovipositor sensilla in *Aganaspis* spp. (A) Distal part of the ovipositor of *A. daci*, showing the ventral paired Valva I and the dorsal fused Valva II; (B) closer view of a part of the Valva I of *A. daci* where the ovipositor sensilla (OS) are visible in pairs; (C) the coeloconic-like morphology of an OS in *A. daci*; (D) distal part of the ovipositor of *A. pelleranoi*, showing the ovipositor clip (OC) on the Valva II.

4. Discussion

4.1. Preimaginal stages

Data concerning the biology and development of *A. daci* under the indicated environmental conditions of temperature, photoperiod, and RH, using *C. capitata* as host, are similar to those obtained previously for this parasitoid on *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) (Clausen et al., 1965). Nevertheless, the aforementioned author reported three larval instars in *A. daci*, while the present study proves the presence of four larval instars. Additionally, this study has established that the first instar larvae of *A. daci* have a pair of unidentate mandibles as indicated by Cals-Usciati et al. (1985), whereas Clausen et al. (1965) stated that the first instar larvae of this parasitoid do not possess visible mandibles.

A. daci presents a stalked egg, typical of the eucoiline figitid. Like the egg of *A. pelleranoi* (Brèthes) (Ovruski, 1994), the egg of *A. daci* is covered by a thin chorion with a stalk at the anterior end and similarly, the stalk disappears when the parasitoid larva is completely formed and the egg is about to hatch. As in eggs of Hymenoptera parasitoids that are deposited internally, the chorion of *A. daci* eggs is smooth (Quicke, 1997; Tormos et al., 2007, 2009a, 2009b). As with cynipoid parasitoid eggs, the *A. daci* egg is divided into a relatively small and narrow egg body and a peduncle, which is not excessively thin or elongated. The eucoiliform early first-instar larva hatches from the membranes surrounding it via the strong muscular action of its tail, appendages, and body. It is also possible that the chorion is broken anteriorly by the mandibles, as reported by Ovruski (1994) in *A. pelleranoi*. In this respect, once the stalk has been lost in the *A. daci* egg, a specialized region is observed at the anterior end of the egg, where the egg shell is distinctly softer. This apparently specialized region of the egg shell, having the morphology of a micropylar region, corresponds more or less to the portion where the peduncle is located. Possibly, it facilitates the emergence of the young larva.

The morphology and development of the larval phase is similar to other figitids, although the following character states differentiate the larval instars of *A. daci* from most other larvae of known eucoilid parasitoids: (1) First-instar larva: (a) *A. daci*, like *A. pelleranoi*, lacks setae upon the mesosomal processes, differently from that reported by Clausen (1972) for *Trybliographa rapae* (Westwood); (b) *A. daci*, unlike *A. pelleranoi*, presents tegumental differentiations in the mesoma and first metasomal segment. (2) Immature (second and third instars) and mature larvae: in *A. daci*, unlike *A. pelleranoi*, the third- and fourth- instar larvae present integument with tegumentary differentiations likely of sensory nature. The lack of detail provided by most descriptions of the eucoilid preimaginal phases does not allow for proper comparison to be made.

The mandibles of different larval instars of *A. daci* are described in less detail than other mouthpart structures because we were not able to obtain adequate SEM micrographs of them. Nevertheless, examining them under a stereomicroscope enabled us to characterize the immature larval instars (in this case unidentate) of the mature larva (in this case bidentate). Under a stereomicroscope, the structure of the first tooth, even the inner margin, was straight, smooth, unserrated, and similar to that reported for *A. pelleranoi* by Ovruski (1994).

With respect to development, the transition from endoparasitic to ectoparasitic life has also been reported for other eucoiline species (Ovruski, 1994; Melk & Govind, 1999). Regarding the time immature stages take to develop, differences observed with respect to other studies (e.g., Papadopoulos & Katsoyannos, 2003) are due to the fact that *A. daci* lays its eggs inside *C. capitata* larvae, which do not hatch until the host larva has formed a pupa. Furthermore, low temperatures, e.g., 20 °C, slow development of the parasitized larvae, causing pupa formation of the different specimens to last longer. This implies an extended duration of the parasitoid immature stages.

4.2. Sensillar equipment

The present descriptions significantly enlarge our knowledge of antennal sensillar equipment in the Cynipoidea, given that previous detailed information is available for only a couple of species (*T. rapae*, *Dryocosmus kuriphilus*; Yasumatsu) (Butterfield & Anderson, 1994; Romani et al., 2010b).

The sensilla placodea of *Aganaspis* spp. are similar to those found in the few other cynipids studied to date (Butterfield & Anderson, 1994; Romani et al., 2010b), and thus probably have the same olfactory function described in other Hymenoptera (Akers & Getz, 1992; Ochieng et al., 2000). The greater abundance of SP found in males compared to females is a common feature in parasitoid Hymenoptera (Baaren et al., 1999; Ochieng et al., 2000; Bleeker et al., 2004), perhaps because males have to recognize more stimuli than females (e.g., plant volatiles and sex pheromones; Whitman & Eller, 1992; Alborn et al., 1995). Possibly, for a similar reason, males also possess two types of sensilla (ST-II and ST-III) which are not present in females.

The SCo-I have been detected in many species of parasitic Hymenoptera (e.g., Bleeker et al., 2004; Onagbola & Fadamiro, 2008), including Cynipoidea (Butterfield & Anderson, 1994; Romani et al., 2010b). SCo-II have previously been described in braconid wasps (Ochieng et al., 2000; Bleeker et al., 2004) but, as far as we know, never in Cynipoidea. The function of SC is still not clear, being described as either olfactory organs (Keil, 1999) or thermo or hygro receptors (Altner et al., 1983).

SCa with similar morphology to that found in *Aganaspis* spp. were observed in both parasitic and aculeate Hymenoptera (sometimes under the name of sensilla coelocapitula; e.g. Romani et al., 2010b; Meng et al., 2012; Polidori et al., 2012). However, here we provide the first evidence that SCa are also present in Cynipoidea. Amputation experiments suggested that their function is not olfactory (Dietz & Humphreys, 1971); instead, electrophysiological studies suggest that SCa are thermo hygrometers (Lacher 1964; Merivee et al., 2003).

With the present data it is difficult to assess the function of the commonest trichoid sensilla (ST-I) in *Aganaspis* spp. The long ST-I were hypothesized to be chemo receptors by contact and the short ST-I to be mechanoreceptors in previously studied cynipoids (Butterfield & Anderson, 1994; Romani et al., 2010b). This is the first description of ST-II and ST-III in Cynipoidea, and their function remains unknown.

The OS found on *Aganaspis* spp. are similar to those described for other Figitidae (Gutiérrez, 1970; Brown & Anderson, 1998; Lenteren et al., 2007). Such coeloconic sensilla were suggested to be mechanoreceptors (Altner & Prillinger, 1980; Brown & Anderson, 1998). Because the pegs protrude above the surface of the cuticle, these sensilla may be used to detect external stimuli during ovipositor movement through the substrate. Other few types of sensilla found on the ovipositor of Figitidae (Brown & Anderson, 1998; Lenteren et al., 2007) were not detected in *Aganaspis* spp.

5. Conclusions

This study has added a considerable amount of new detailed morphological data on both immature stages and adults in a group of parasitic wasps. Past studies were mostly lacking in the fine level of analysis achieved only through combined SEM and light microscopy. Finer detailed morphological studies of such wasps, which are parasitoids of important fruit pests, are necessary because successful biological control against pests depends, among other things, on the ability to recognize natural parasitoid species even at larval stages. However, this is only possible by (microscopic) comparison with previously acquired morphological data on the different phases of development. Furthermore, microscopic analysis is extremely useful to test for numerous effects, such as different nutritional regimes or different temperatures on the size and morphology of both larval and adult parasitoids. Such information is useful to optimize rearing conditions, before releasing the wasps in the field to control pests. It is also important to understand the sensory basis of host recognition, and one important step in this respect is to analyze the morphology of sensory structures in detail, and to eventually compare them among wasp species differing in host niche spectrum and host specialization. From this point of view, further investigations by means of histological techniques and SEM observations are necessary to better understand the function of each type of sensilla.

Acknowledgments

We thank Alberto Jorge García (Museo Nacional de Ciencias Naturales) for assistance during the SEM sessions in Madrid. Pablo Montoya (Programa Moscafrut SAGARPA-IIC, México), kindly provided the *A. pelleranoi* specimens. The research was supported by a grant from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spanish Government) (CGL2010-16730). CP was funded by a post-doctoral contract [Program JAE-Doc “Junta para la Ampliación de Estudios” funded by the Spanish Research Council (CSIC) and the FSE].

References

- AKERS, R.P. & GETZ, W.M. (1992). A test of identified response classes among olfactory receptor neurons in the honey-bee worker. *Chem Senses* **17**, 191–209.
- ALBORN, H.T., LEWIS, W.J. & TUMLINSON, J.H. (1995). Host-specific recognition kairomone for the parasitoid *Microplitis croceipes* (Cresson). *J Chem Ecol* **21**, 1697–1708.
- ALTNER, H. (1977). Insect sensillum specificity and structures: An approach to a new typology. In *Olfaction and Taste VI*, Le Magnen, L. & MacLeod, P. (Eds.), pp. 295–303. Paris: IRL.
- ALTNER, H. & PRILLINGER, L. (1980). Ultrastructure of invertebrate chemo-, thermo-, and hygroreceptors and its functional significance. *Int Rev Cytol* **67**, 69–139.
- ALTNER, I., HATT, H. & ALTNER, H. (1983). Structural properties of bimodal chemo- and mechanoreceptive setae on the pereopods chelae of the crayfish, *Austropotamobius torrentium*. *Cell Tissue Res* **228**, 357–374.
- ANDLEEB, S., SHAHID, M.S. & MEHMOOD, R. (2010). Biology of parasitoid *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Eucoilidae). *Pak J Sci Ind Res* **53**, 201–204.
- BAAREN, J. VAN, BOIVIN, G., BOURDAIS, D. & ROUX, O. (2007). Antennal sensilla of hymenopteran parasitic wasps: Variations linked to host exploitation behavior. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, Méndez-Vilas, A. & Díaz, J. (Eds.), pp. 345–352. Badajoz, Spain: Formatex.
- BAAREN, J. VAN, BOIVIN, G., LE LANNIC, J. & NÉNON, J.P. (1999). Comparison of antennal sensilla of *Anaphes victus* and *A. listronoti* (Hymenoptera: Mymaridae), egg-parasitoids of Curculionidae. *Zoomorphology* **119**, 1–8.

- BARANOWSKI, R., GLENN, H. & SIVINSKI, J. (1993). Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Fla Entomol* **76**, 245–251.
- BEITIA, F., PÉREZ-HINAREJOS, M., SANTIAGO, S., GARZÓN, E., TARAZONA, I. & FALCÓ, J.V. (2009). Control biológico con parasitoides. *Levante agrícola* **385**, 145–150.
- BELLOWS, T.S. & VAN DRIESCHE, R.G. (1999). Life table construction and analysis for evaluating biological control agents. In *Handbook of Biological Control. Principles and Applications of Biological Control*, Bellows, T.S. & Fisher, T.W. (Eds.), pp. 199–223. San Diego, CA: Academic Press.
- BLEEKER, M.A.K., SMID, H.M., AELST, A.C., VAN LOON, J.J.A. & VET, L.E.M. (2004). Antennal sensillae of two parasitoid wasps: A comparative scanning electron microscopy study. *Microsc Res Tech* **63**, 266–273.
- BROWN, P.E. & ANDERSON, M. (1998). Morphology and ultrastructure of sense organs on the ovipositor of *Trybliographa rapae*, a parasitoid of the cabbage root fly. *J Insect Physiol* **44**, 1017–1024.
- BUTTERFIELD, A. & ANDERSON, M. (1994). Morphology and ultrastructure of antennal sensilla of the parasitoid, *Trybliographa rapae* (Westw.) (Hymenoptera: Cynipidae). *Int J Insect Morphol Embryol* **23**, 11–20.
- CALLAHAN, P.S. (1975). Insect antennae with special reference to the mechanism of scent detection and the evolution of the sensilla. *Int J Insect Morphol Embryol* **4**, 381–430.
- CALS-USCIATI, J., CALS, P. & PRALAVORIO, R. (1985). Functional adaptations of the feeding mechanism in the primary larva of *Trybliographa daci* Weld (Hymenoptera, Cynipoidea), endoparasitoid of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *C R Seances Acad Sci, Ser 3* **300**, 103–108.
- CLAUSEN, C.P. (1972). *Entomophagous Insects*. New York: Hafner Publishing Company.
- CLAUSEN, C.P. (1978). *Introduced Parasites and Predators of Arthropod Pests and Weeds: A World Review*. Washington D.C.: U.S. Department of Agricultural Handbook.
- CLAUSEN, C.P., CLANCY, D.W. & CHOCK, Q.C. (1965). Biological control of the oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. *Agri Res Serv* **1322**, 1–102.

- DÍAZ, N.B., GUIMARAES, J.A. & GALLARDO, F.E. (2006). Systematic review of species of the genus *Aganaspis* Lin (Hymenoptera: Figitidae: Eucoilinae). *T Am Entomol Soc* **132**, 271–277.
- DIETZ, A. & HUMPHREYS, J. (1971). Scanning electron microscopic studies of antennal receptors of the worker honey bee, including *Sensilla campaniformia*. *Ann Entomol Soc Am* **64**, 919–925.
- EL-HENEIDY, A.H. & RAMADAN, M.M. (2010). *Bactrocera zonata* (Saunders) status and its natural enemies in Egypt. In *8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, p. 115. Valencia, Spain: Editorial Universitat Politècnica de València.
- EVANS, H.E. (1987). Cynipoidea. In *Immature Insects*, Stehr, F.W. (Ed.), pp. 665–667. Dubuque, IA: Kendall/Hunt Publishing Co.
- GUIMARAES, J.A. & ZUCCHI, R.A. (2004). Parasitism behavior of three species of Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) fruit fly parasitoids (Diptera) in Brazil. *Neotrop Entomol* **33**, 217–224.
- GUTIÉRREZ, A.P. (1970). Studies on host selection and host specificity of the aphid hyperparasite *Charips victrix* (Hymenoptera: Cynipidae). 6. Description of sensory structures and a synopsis of host selection and host specificity. *Ann Entomol Soc Am* **63**, 1705–1709.
- ISIDORO, N., BIN, F., COLAZZA, S. & VINSON, S.D. (1996). Morphology of antennal gustatory sensilla and glands in some parasitoids Hymenoptera with hypothesis on their role in sex and host recognition. *J Hym Res* **5**, 206–239.
- JERVIS, M.A., COPLAND, M.J.W. & HARVEY, J.A. (2005). The life cycle. In *Insects as Natural Enemies. A Practical Perspective*, Jervis, M.A. (Ed.), pp. 112–196. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.
- KEIL, T.A. (1999). Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In *Insect Olfaction*, Hansson, B.S. (Ed.), pp. 5–47. New York: Springer-Verlag.
- LACHER, V. (1964). Elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Rezeptoren für Geruch, Kohlendioxid, Luftfeuchtigkeit and Temperatur auf den Antennen der Arbeitsbiene und der Drohne (*Apis mellifera* L.). *Z Verg Physiol* **48**, 587–625.

- LENTEREN, J.C. VAN, RUSCHIONI, S., ROMANI, R., VAN LOON, J.J.A., QIU, Y.T., SMID, H.M., ISIDORO, N. & BIN, F. (2007). Structure and electrophysiological responses of gustatory organs on the ovipositor of the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Arthropod Struct Dev* **36**, 271–276.
- LLÁCER, E., URBANEJA, A., GARRIDO, A. & JACAS, J. (2005). Morphology and development of immature stages of *Galleosomyia fausta* (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). *Ann Entomol Soc Am* **98**, 747–753.
- MELK, J.P. & GOVIND, S. (1999). Developmental analysis of *Ganaspis xanthopoda*, a larval parasitoid of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **202**, 1885–1896.
- MENG, Z.J., YAN, S.C., YANG, C.P. & RUAN, C.C. (2012). Asymmetrical distribution of antennal sensilla in the female *Anastatus japonicus* Ashmead (Hymenoptera: Eupelmidae). *Microsc Res Tech* **75**, 1066–1075.
- MERIVEE, E., VANATOVA, A., LUIK, A., RAHI, M., SAMMELSELG, V. & PLOOMI, A. (2003). Electrophysiological identification of cold receptors on the antennae of the ground beetle *Pterostichus aethiops*. *Physiol Entomol* **28**, 88–96.
- NIEVES-ALDREY, J.L., VÅRDAL, H. & RONQUIST, F. (2004). Comparative morphology of terminal-instar larvae of Cynipoidea: Phylogenetic implications. *Zool Scr* **34**, 15–36.
- OCHIENG, S.A., PARK, K.C., ZHU, J.W. & BAKER, T.C. (2000). Functional morphology of antennal chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). *Arthropod Struct Dev* **29**, 231–240.
- ONAGBOLA, E.O. & FADAMIRO, H.Y. (2007). Morphology and development of *Pteromalus cerealellae* (Ashmead) (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biocontrol* **53**, 737–750.
- ONAGBOLA, E.O. & FADAMIRO, H.Y. (2008). Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Micron* **39**, 526–535.
- OVRUSKI, S.M. (1994). Immature stages of *Aganaspis pelleranoi* (Brethes) (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae), a parasitoid of *Ceratitis capitata* (Wied.) and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). *J Hym Res* **3**, 233–239.

- OVRUSKI, S.M. & ALUJA, M. (2002). Mating behavior of *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae, Eucoilinae), a fruit fly (Diptera: Tephritidae) larval parasitoid. *J Insect Behav* **15**, 139–151.
- OVRUSKI, S.M., ALUJA, M., SIVINSKI, J. & WHARTON, R. (2000). Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin American and the southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Manag Rev* **5**, 81–107.
- PAPADOPOULOS, N.T. & KATSOYANNOS, B.I. (2003). Field parasitism of *C. capitata* larvae by *Aganaspis daci* in Chios, Greece. *Biocontrol* **48**, 191–195.
- POLIDORI, C., JORGE GARCÍA, A. & NIEVES-ALDREY, J.L. (2012). Antennal sensillar equipment in closely related predatory wasp species (Hymenoptera: Philanthinae) hunting for different prey types. *C R Biol* **335**, 279–291.
- QUICKE, D.L.J. (1997). *Parasitic Wasps*. London: Chapman & Hall.
- ROMANI, R., ISIDORO, N. & BIN, F. (2010a). Antennal structures used in communication by egg parasitoids. In *Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*, Consoli, F.L., Parra, J.R.P. & Zucchi, R.A. (Eds.), pp. 57–96. New York: Springer.
- ROMANI, R., RONDONI, G., GRAGNOLI, L., PERGOLARI, P., SANTINELLI, C., ROSSI STACCONI, M.V. & RICCI, C. (2010b). Indagini bio-etologiche e morfologiche su *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu. In *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia Anno LVIII*, 97–104.
- ROSKAM, J.C. (1982). Larval characters of some eurytomid species Hymenoptera, Chalcidoidea. *Proc Kon Ned Akad Wet* **85**, 293–305.
- TORMOS, J., ASÍS, J.D., GAYUBO, S.F. & MARTÍN, M.A. (2004). Descriptions of the final instar of *Eurytoma nodularis* and *E. heriadi* (Hymenoptera: Eurytomidae). *Fla Entomol* **87**, 278–282.
- TORMOS, J., BEITIA, F., BÖCKMANN, E.A. & ASÍS, J.D. (2009a). The preimaginal stages and development of *Spalangia cameroni* Perkins (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Micron* **40**, 646–658.

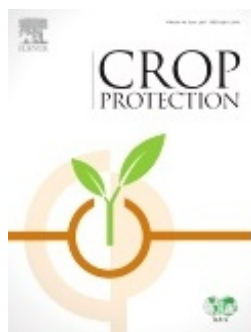
- TORMOS, J., BEITIA, F., BÖCKMANN, E.A., ASÍS, J.D. & FERNÁNDEZ, S. (2009b). The preimaginal phases and development of *Pachycrepoideus vindemmia* (Hymenoptera, Pteromalidae) on Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Microsc Microanal* **15**, 422–434.
- TORMOS, J., FRAGO, E., SELFA, J., ASÍS, J.D., PUJADE-VILLAR, J. & GUARA, M. (2007). Description of the final instar larva of *Trichomalopsis peregrina* (Hymenoptera, Pteromalidae), with data and comments on the preimaginal stages. *Fla Entomol* **90**, 180–183.
- TORMOS, J., PARDO, X., JIMÉNEZ, R., ASÍS, J.D. & GAYUBO, S.F. (2003). Descriptions of adults, immature stages and venom apparatus of two new species of Dacnusiini: *Chorebus pseudoasphodeli* sp. n., parasitic on *Phytomyza chaerophili* Kaltenbach and *C. pseudoasramenes* sp. n., parasitic on *Cerodontha phragmitophila* Hering (Hymenoptera: Braconidae: Alysini; Diptera: Agromyzidae). *Eur J Entomol* **100**, 393–400.
- VÅRDAL, H., SAHLEN, G. & RONQUIST, F. (2003). Morphology and evolution of the cynipoid egg (Hymenoptera). *Zool J Linn Soc* **139**, 247–260.
- WELD, L.H. (1951). A new species of *Trybliographa* (Hymenoptera: Cynipidae). *Proc Hawaii Entomol Soc* **14**, 331–332.
- WHARTON, R.A., GILSTRAP, F.E., RHODEI, R.H., FISCHER, M.M. & HART, W.G. (1981). Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Costa Rica. *Entomophaga* **26**, 285–290.
- WHITMAN, D.W. & ELLER, F.J. (1992). Orientation of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) to green leaf volatiles: Dose-response curves. *J Chem Ecol* **18**, 1743–1753.

CAPÍTULO 3

“Effect of temperature on the developmental time, survival of immatures and adult longevity of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a natural enemy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)”

Efecto de la temperatura sobre el tiempo de desarrollo, la supervivencia de inmaduros y la longevidad de adultos de *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), enemigo natural de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Luis de Pedro, Francisco Beitia, Beatriz Sabater-Muñoz, Josep Daniel Asís, José Tormos



Crop Protection 85 (2016) 17–22

Factor de impacto (2016): 1.834

ISSN: 0261-2194

Resumen: La longevidad, el tiempo de desarrollo y la supervivencia de la descendencia en avispa parasitoides son factores decisivos sobre su posible acción a modo de agentes de control biológico. El rango óptimo de temperatura determina la supervivencia del parasitoide, su desarrollo y su reproducción. Así, el control de este factor abiótico es clave para el éxito de programas de manejo de plagas. La longevidad de los adultos, el tiempo de desarrollo (desde huevo hasta adulto) y la supervivencia de inmaduros de *Aganaspis daci* se evaluaron en el laboratorio bajo diferentes temperaturas constantes; se midió la longevidad de los adultos en ausencia de hospedadores, pero con disponibilidad de agua y miel; y el tiempo de desarrollo y la supervivencia de inmaduros desde pupas del hospedador, cuyas larvas habían sido expuestas al parasitoide. Los resultados mostraron que la longevidad dependía de la temperatura, decreciendo en el rango de 15 a 20 °C (36–25 días), pero siendo más baja en el rango de 25 a 35 °C (10–7 días). Respecto al tiempo de desarrollo desde huevo hasta adulto y la supervivencia de inmaduros, nuestros resultados mostraron que 20 y 25 °C son las temperaturas más adecuadas. A 15 y 30 °C la mortalidad de las fases inmaduras era muy alta (>90%) o bien el tiempo de desarrollo hasta la fase adulta se prolongaba mucho (>3 meses). Los inmaduros no sobrevivían a 35 °C. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de desarrollo hasta la fase adulta o en la supervivencia de inmaduros entre 20 y 25 °C. El sex ratio de la descendencia del parasitoide estaba desplazado hacia las hembras a 25 °C; la proporción de hembras se incrementaba, en todos los casos, con la temperatura. La t_0 y la K para el desarrollo total fueron de 8.5 °C y 500 DD, respectivamente. Estos hallazgos aportan información útil para posibles liberaciones futuras en campo, inundativas o inoculativas, de este parasitoide para el manejo de *Ceratitis capitata* en España.



Contents lists available at ScienceDirect

Crop Protection

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cropro

Effect of temperature on the developmental time, survival of immatures and adult longevity of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a natural enemy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)



Luis de Pedro^{a, b, *}, Francisco Beitia^b, Beatriz Sabater-Muñoz^c, Josep Daniel Asís^a, José Tormos^a

^a Universidad de Salamanca, Facultad de Biología, Unidad de Zoología, 37007, Salamanca, Spain

^b Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología, IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial, 46113, Montcada, Valencia, Spain

^c Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublin, Ireland

Abstract: Longevity, developmental time and offspring survival of parasitoid wasps are decisive in their effective performance as biocontrol agents. Optimum temperature range determines parasitoid survival, development and reproduction. Thus, controlling this abiotic factor is a key to the success of pest management programs. Adult longevity, developmental time from egg to adult and survival of immatures of *Aganaspis daci* were assessed in the laboratory under different constant temperatures; adult longevity without hosts, but with the provision of water and honey, and developmental time and survival of immatures from host pupae, whose larvae had been exposed to parasitoids. Results showed that longevity depended on temperature decreasing in the range 15–20 °C (36–25 days), but was lower in the range 25–35 °C (10–7 days). Regarding developmental time from egg to adult and survival of immatures, our results showed that 20 and 25 °C are the most suitable temperatures. At 15 and 30 °C mortality of the immature stages was very high (> 90%) or developmental time to adult was very slow (> 3 months). Immatures did not survive at 35 °C. We found no significant differences in developmental time to adult or survival of immatures between 20 and 25 °C. The sex ratio of parasitoid progeny was female biased at 25 °C; the proportion of females increased at all cases with temperature. The t_0 and K for total development were 8.5 °C and 500 DD, respectively. Our findings provide some guidance for future inundative or inoculative field releases of this parasitoid for the management of *Ceratitis capitata* in Spain.

Keywords: Medfly; *Aganaspis daci*; Longevity; Developmental time; Thermal requirements.

1. Introduction

Aganaspis daci (Weld) (Hymenoptera: Figitidae), a larval-pupal solitary primary endoparasitoid, is an efficient fruit-fly pest-control agent, which has been successfully used to control *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) (Baranowski et al., 1993). This species was first recorded in 1951 as a larval parasitoid of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (= *Dacus dorsalis*) (Diptera: Tephritidae) in Malaysia and Taiwan (Weld, 1951). Since then, it has been introduced into several countries to control tephritid species (Clausen, 1978; Wharton et al., 1981). In the Mediterranean basin, the first record of *A. daci* parasitizing larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) was on the Greek Island of Chios in 2003 (Papadopoulos and Katsoyannos, 2003). Lately, it has been introduced in Israel and Egypt from a “colony” bred in USDA-ARS Hawaii (El-Heneidy and Ramadan, 2010). In Spain, only the species *Spalangia cameroni* Perkins and *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) were found as native pupal parasitoids of the medfly, with no records of *A. daci* during a four-year survey (2000–04). In 2003, an ongoing biocontrol project was started with several imported exotic egg-larval parasitoids: *Fopius arisanus* (Sonan), *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) and *D. longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Following the release trials of these species (2007–12), several specimens of *A. daci* were recovered from medfly larva collected from fig and citrus fruits in the summer of 2009. Phylogenetic analysis of cytochrome oxidase I (COI) and internal transcribed spacer (ITS) sequences from Spanish specimens confirmed their assignment to this species after comparison with individuals from Greece, Israel, Hawaii and Egypt, and to the closely related species *Aganaspis pelleranoi* (Brethes) and *Ganaspis xanthopoda* (Ashmead) (Hymenoptera: Figitidae) (Sabater-Muñoz et al., 2012). At present, the biology of this parasitoid on *C. capitata* is under study to assess its adaptability to mass rearing.

Despite the aforementioned research, to date little attention has been paid to those aspects of *A. daci* biology that may contribute to its use in biological monitoring projects. Among contributors to this field, we should highlight Clausen et al. (1965); Nuñez-Bueno (1982); Ovruski (1994); Andleeb et al. (2010); Hosni et al. (2011) and Tormos et al. (2013). Here we have investigated and reported on adult *A. daci* longevity without hosts, developmental time from egg to adult and survival of immatures in laboratory conditions (at several constant temperatures). Thermal constants are often used to create predictive models of pest development in various environments, for example: stored products, greenhouses and orchards, and the knowledge of thermal constants provide essential information to determine the development thresholds and the development rates of arthropod species (Malina and Praslička, 2008). Longevity and development rate usually play a key role in the effectiveness of parasitoid species

as biocontrol agents. We have analysed these parameters of the biotic potential for an environmental variable, namely temperature, with the object to evaluate the potential of this parasitoid as a biological agent to control *C. capitata*.

2. Materials and methods

2.1. Study centre and insects

A. daci was obtained from a laboratory colony housed at the Valencian Institute of Agrarian Research [Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, Spain]. This colony was established in 2010 with specimens obtained from medfly larvae taken from figs in a nearby Valencian village (Bétera, Spain). Since then, a laboratory rearing has been maintained on the host *C. capitata* (Martínez-Torres, 2011). The medfly has been reared at the IVIA for over 6 years, following the methodology of Pérez-Hinarejos and Beitia (2008). Experiments comply with Spanish law currently in force.

2.2. Experimental design

Two experiments were conducted to assess the effect of the temperature on the longevity and the developmental time from egg to adult and survival of immatures of *A. daci*. Both experiments were run in a climate cabinet (Sanyo MLR 350; Sartorius, Barcelona, Spain) under the following constant temperatures (with a variation (SD) of ± 0.2 °C): 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C and 35 °C, 65 \pm 10% relative humidity and 16:8 h (light/darkness) photoperiod. L3 (third instar larvae) not exposed to parasitoids were used as control.

In experiment 1, we analysed longevity of males and females until adult death. In the assays we used translucent plastic ventilated cylinders (15 x 20 cm) with 10 individuals, from a newly emerged cohort (males or females), supplied with water and honey ad libitum. There were three replicates for each sex and each temperature. Cylinders were checked daily and mortality rates recorded.

Experiment 2 was designed to evaluate the developmental time and survival of immatures until adult emergence. In the assays we used translucent plastic boxes (20 x 15 x 10 cm), with 330 L3 of *C. capitata* that had been exposed in artificial diet previously to parasitism by a rearing cohort for 4 h. This cohort consisted of 100 males and 100 females, between 6 and 8 days old, kept separate from their hosts during 24 h in order to obtain a homogeneous clutch. There were three replicates for each temperature. Translucent plastic boxes were checked from the host pupation (2 or 3 days after exposing L3 to parasitoids) and emergence, sex ratio (males%) and mortality rates were recorded.

2.3. Statistical analysis

The effect of temperature on the longevity of adult parasitoids, as well as on developmental time from egg to adult emergence, was represented by Kaplan–Meier survivorship curves. Log-rank and Breslow tests were used with a survival model to compare longevity, and developmental time from egg to adult, between different constant temperatures. The relationships between the sex ratio and the temperature were analysed by Chi squared analysis (χ^2). The χ^2 was applied to a 2 x 2 contingency table with sex and temperature as the defining factors. Additionally, a linear regression was applied to show the effect of temperature on sex ratio as well as to compute the lower developmental thresholds of *A. daci*, using developmental rate data (1/D, D being the time in days required for total development from egg to adult at the different temperatures) as dependent variables (y-axis) and constant temperature treatments of 15–30 °C as independent variables (x-axis). The lower developmental threshold (t_0) was determined as x-intercept of the linear equation ($y = 0$). The thermal units (K, DD = degree-day) required for the time to become an adult is given by the inverse of the equation slope (Campbell et al., 1974). Values are reported as means \pm SE. Analyses were performed using the IBM SPSS statistical software package (v20; critical p value used 0.05).

3. Results

3.1. Experiment 1

The log-rank test revealed that the longevity of *A. daci* (Table 1) differed significantly with respect to temperature in both males [Global Log-rank test: $\chi^2 = 155.896$; $df = 4$; $P < 0.001$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 122.399$; $df = 4$; $P < 0.001$] and females [Global Log-rank test: $\chi^2 = 181.365$; $df = 4$; $P < 0.001$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 134.538$; $df = 4$; $P = 0.001$], except between 25 °C and 30 °C in males [Log-rank test: $\chi^2 = 0.610$; $df = 1$; $P = 0.435$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 0.076$; $df = 1$; $P = 0.782$] and 30 °C and 35 °C in females [Log-rank test: $\chi^2 = 0.707$; $df = 1$; $P = 0.400$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 0.635$; $df = 4$; $P = 0.426$], but did not differ for sex [Global Log-rank test: $\chi^2 = 1.008$; $df = 1$; $P = 0.315$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 0.125$; $df = 1$; $P = 0.723$], except at 15 °C [Global Log-rank test: $\chi^2 = 4.826$; $df = 1$; $P = 0.028$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 5.089$; $df = 4$; $P = 0.024$] and at 30 °C [Global Log-rank test: $\chi^2 = 10.814$; $df = 1$; $P = 0.001$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 11.462$; $df = 4$; $P = 0.001$].

Table 1. Adult longevity of *A. daci* in days, at five constant temperatures. In each column and row, medians with different letter (lowercase: column, capital letters: row) differ significantly at 95% level.

Temperature (°C)	Longevity (days; median ± S.E.)		Range	
	Males	Females	Males	Females
15	27 ± 1.37 aA	37 ± 2.05 aB	16–47	16–50
20	23 ± 1.64 bA	25 ± 0.91 bA	11–35	14–35
25	9 ± 0.54 cA	11 ± 0.32 cA	5–20	6–17
30	11 ± 0.37 cA	8 ± 0.39 dB	5–13	4–15
35	8 ± 0.68 dA	7 ± 0.22 dA	3–13	3–12

3.2. Experiment 2

The log-rank and Breslow tests revealed that the developmental time together with survival of immatures until adult emergence of *A. daci* (Table 2) differed significantly with respect to temperature (both, pairwise temperatures as pooled) in both males [Fig. 1, Global Log-rank test: $\chi^2 = 1466.834$; $df = 3$; $P < 0.001$; Global Breslow test: $\chi^2 = 1479.727$; $df = 3$; $P < 0.001$], and females [Fig. 2, Global Log-rank test: $\chi^2 = 638.963$; $df = 3$; $P < 0.001$; Global Breslow test: $\chi^2 = 598.742$; $df = 3$; $P < 0.001$], and also differed with respect to sex [Fig. 3, Log-rank test: $\chi^2 = 133.180$; $df = 1$; $P < 0.001$; Global Breslow test: $\chi^2 = 138.603$; $df = 1$; $P < 0.001$], except at 15 °C [Global Log-rank test: $\chi^2 = 1.463$; $df = 1$; $P = 0.226$; Global Breslow (generalized Wilcoxon) test: $\chi^2 = 1.510$; $df = 1$; $P = 0.219$].

There were significant differences in the sex ratio (Table 3) with temperature in the range studied: 15–25 °C ($\chi^2 = 10.621$; $df = 1$; $P = 0.001$), 15–30 °C ($\chi^2 = 5.098$; $df = 1$; $P = 0.034$), 20–25 °C ($\chi^2 = 21.36$; $df = 1$; $P = 0.001$) and 20–30 °C ($\chi^2 = 8.807$; $df = 1$; $P = 0.003$), except for 15–20 °C and 25–30 °C. The sex ratio at 20 °C ($\chi^2 = 21.845$; $df = 1$; $P < 0.001$) and 25 °C ($\chi^2 = 4.669$; $df = 1$; $P = 0.03$) was significantly biased toward males and females, respectively. At 15 °C and 30 °C, on the other hand, the sex ratio lightly biased toward males and females, respectively, though the difference was not statistically significant. A linear regression analysis (Fig. 4) revealed a significant relationship between the temperature rise and

the sex ratio (the proportion of females increases with temperature) ($F = 70.673$; $df = 1, 11$; $P < 0.001$; $R^2 = 0.876$).

A linear regression analysis comparing temperature treatment (15–30 °C) with parasitoid developmental rate resulted in the equation $y = 0.002x - 0.017$ ($R^2 = 0.961$; $F = 246.374$; $df = 1, 11$; $P < 0.001$). Therefore, the adult parasitoid required 500 DD above a lower developmental threshold of 8.5 °C.

Table 2. Parasitism and developmental time obtained at different temperature from exposure for 4 h of 330 L3 of *C. capitata* to cohorts of 200 parasitoids (100 ♂♂ and 100 ♀♀) of *A. daci* of \approx 6–8 days of age. Exposure was carried out in translucent plastic boxes (20 x 15 x 10 cm) placed in a climatic chamber (T°: 15 °C/20 °C/25 °C/30 °C/35 °C, RH: 65 \pm 10%, photoperiod: 16L:D8). [n = 3 replicates exposures for each temperature].

Temperature (°C)	L3 exposed to parasitoids					⁽¹⁾ Developmental time (days)					
	Total	⁽²⁾ Parasitised ^a		Censored ^b	Control ^c	Males (mean \pm S.E)	Females (mean \pm S.E)	Range			
		Males	Females					Total	Mortality (%)	Males	Females
15	990	4.81%	3.13%	7.95%	92.05(%)	300	4.33(%)	100.75 \pm 1.79	102.40 \pm 2.60	91–115	92–115
20	990	34.11%	22.82%	56.93%	43.07(%)	300	0.36(%)	38.39 \pm 0.76	38.18 \pm 1.06	15–57	15–57
25	990	35.95%	41.89%	77.84%	22.16(%)	300	0.26(%)	28.24 \pm 0.13	31.89 \pm 0.19	25–40	27–42
30	990	2.88%	4.23%	7.12%	92.88(%)	300	0.16(%)	26.62 \pm 0.34	27.75 \pm 0.28	23–29	24–31
35	990	–	–	–	100(%)	300	1.6(%)	–	–	–	–

^aParasitised pupae (parasitized pupae from which emerged parasitoids).

^bCensored pupae (dead, aborted parasitoid...).

^cControl (aborted pupae of *C. capitata* according the temperature).

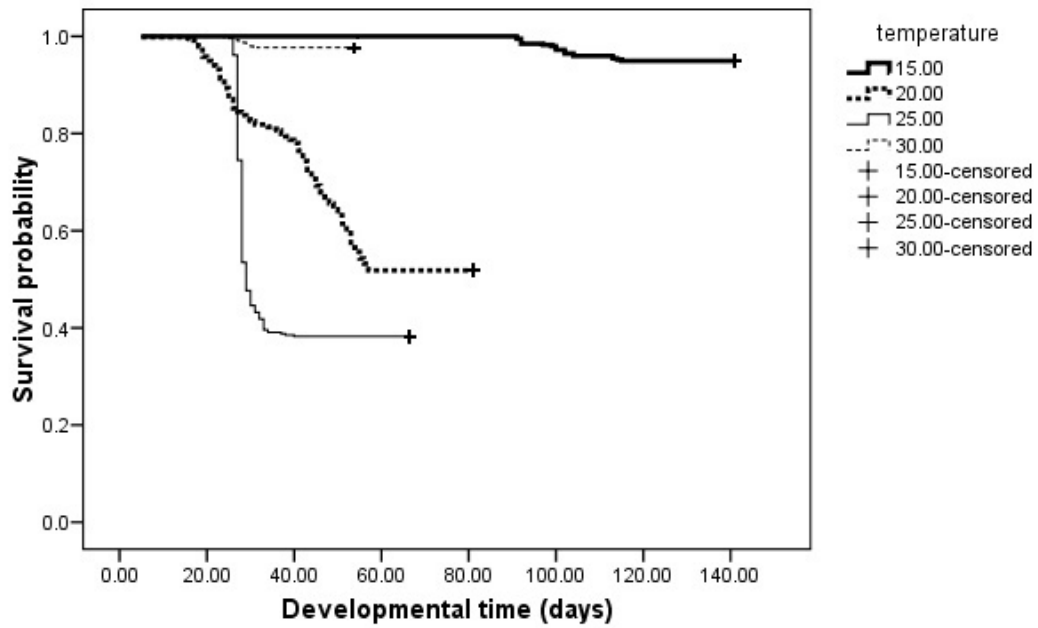


Fig. 1. Survivorship curves from egg to adult emergence for *Aganaspis daci* males at different constant temperatures.

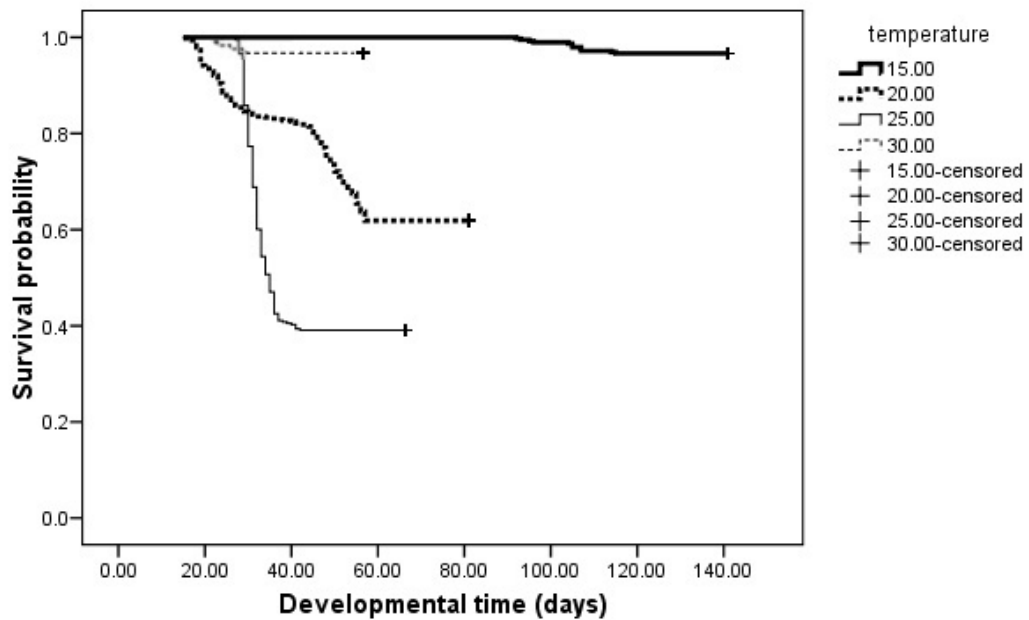


Fig. 2. Survivorship curves from egg to adult emergence for *Aganaspis daci* females at different constant temperatures.

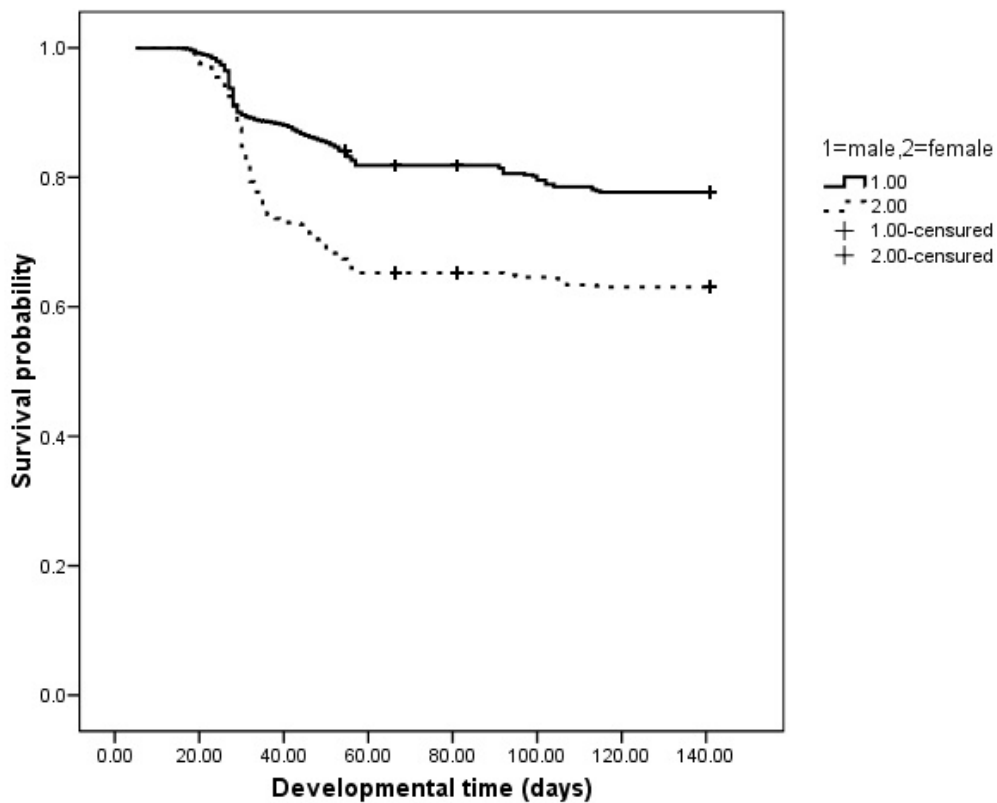


Fig. 3. Survivorship curves from egg to adult emergence for *Aganaspis daci*, according to sex.

Table 3. Sex ratio (number males/number males + females) at different temperatures. Proportions of males with different capital letter differ significantly at 95% level. The * indicates a significant bias towards males or females.

Temperature (°C)	Sex ratio (% male)
15	60 A
20	*59 A
25	*46 B
30	41 B
35	-

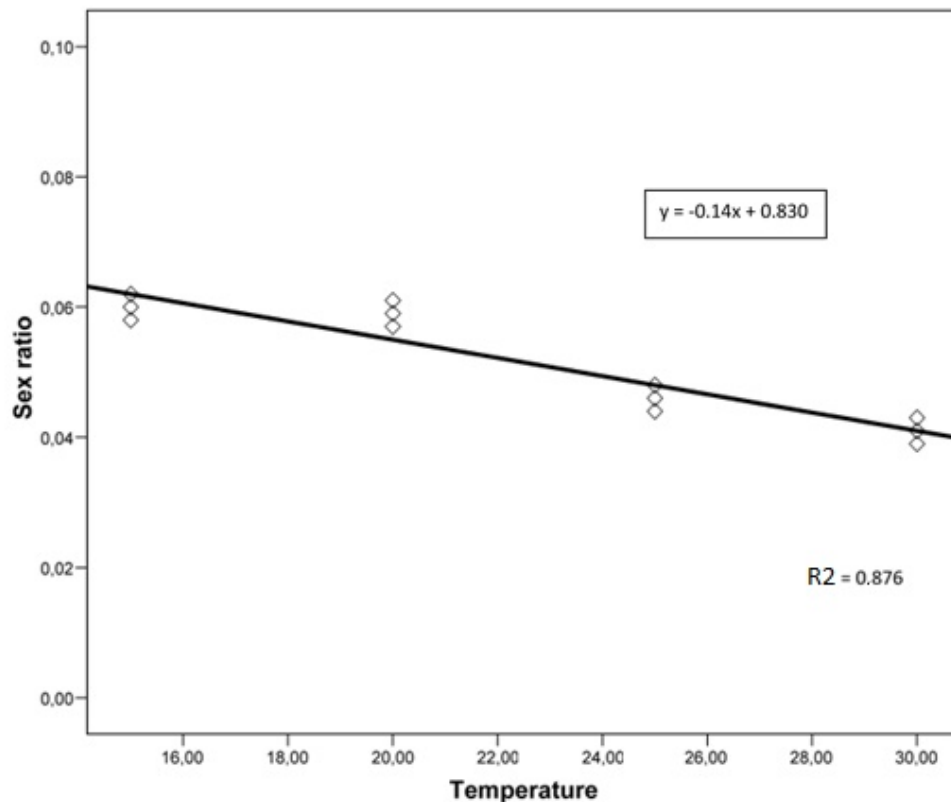


Fig. 4. Relationship between the temperature rise and the sex ratio* (the proportion of females increases with temperature). *number males/number males + females.

4. Discussion and conclusions

Regarding insect life-span, the duration of an insect adult life is usually referred to as longevity (Blackburn, 1991a, b).

Many evolutionary biologists have explored longevity in insects (natural enemies) because it is a component of individual fitness (Rivero and West, 2002) and can be considered as an indicator of survival capacity. Likewise its relationship to female fecundity, prey death rate and predator growth rate are of interest from the point of view of population dynamics (Jervis, 2005).

Longevity is a highly variable species characteristic, influenced by both physical and biotic factors (Jervis, 2005; Tormos et al., 2012). Regarding physical factors little is known about the influence of photoperiod on longevity (Jervis, 2005). By contrast, many experimental studies reveal that natural enemies have optimum humidity and temperature ranges, outside which the survival is severely compromised (Wysocki et al., 1988; Herard et al., 1988; Krishnamoorthy, 1989; Jervis, 2005).

The results obtained in this study on *A. daci* show that longevity decreases with increasing temperature within the effective range, usually in both males and females (McDougall and Mills, 1997; Liu and Tsai, 2002; Seal et al., 2002; Jervis, 2005). In this respect, the average summer temperatures in the Valencia region (Spain) [in the last ten years ranged between 22 and 27 °C (IVIA's meteorological data, <http://riegos.ivia.es>)] indicate that *A. daci* can adapt well to the climate in this region. Garzón-Luque et al. (2008) reported similar results for another *C. capitata* parasitoid: *D. tryoni*. Further evidence is that *A. daci* was commonly recovered from field samples in 2003 with reports of high rates of parasitism (Papadopoulos and Katsoyannos, 2003; Karamouna et al., 2010) in Mediterranean areas with similar climate to the Valencian region. These data also support the hypothesis that this species can survive the winter in this area, further evidenced by the fact that it has been found living in the wild for three consecutive years in Valencia (de Pedro et al., 2013).

Regarding the other parameter of biotic potential studied here, developmental time to adult, the results obtained in this study show that temperature significantly influences bionomics of the parasitoid species. This is consistent with earlier findings for the same parasitoid species on other tephritid flies. For example, according to Andleeb et al. (2010) the duration of the life cycle of *A. daci* males and females was 16–18 days and 18–20 days, respectively, on *Bractrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae) at 24–26 °C, and 54–56% relative humidity. By contrast, Hosni et al. (2011) reported 25.3 days on the same host at 25 ± 2 °C, 54–65% relative humidity and 14:10 h (light/darkness) photoperiod. According to other authors (Fernandes-Da-Silva and Zucoloto, 1993; Duyck et al., 2004), these discrepancies could be due, in addition to environmental variables, to differences among pest strains in different geographical areas, or the type of food provided for the larvae. Additionally, our results indicated that none of the *A. daci* immatures survived to complete their development at 35 °C.

Low temperature thresholds for *C. capitata* (10 °C) (Szyniszewska and Tatem, 2014) and for *A. daci* reared on *C. capitata* (8.5 °C) confirm that these species are well adapted to a wide-ranging temperature climate and, therefore, to the Mediterranean area. The developmental threshold of the parasitoid *A. daci* is lower than that of the *C. capitata*, thus this parasitoid should be present in the field earlier than the host, and already be well established when host populations begin to grow. Nevertheless, it should be pointed out that both high temperatures (between 30 and 35 °C) and low temperatures (around 15 °C) lead to slow and long developmental time and poor offspring survival in *A. daci*. These results, together with the fact that sex ratio was male biased at 15 °C, suggest that this parasitoid may not reach sufficient levels to control adequately *C. capitata* in field conditions. Additionally, it is possible that this parasitoid could have better performance under fluctuating conditions. In this respect, data obtained in the Valencia region (Spain) (de Pedro et al., 2013) about *A. daci* field parasitism on

C. capitata show that, even though *A. daci* is able to parasitize the medfly at any time of year, Mediterranean climate variability has a negative impact on development, emergence and survival of parasitoid immature stages. The K obtained in the results for total development of *A. daci* (this species required 500 DD above a lower developmental threshold of 8.5 °C) is informative only as we are aware that an estimation of degree-days in the laboratory is not adequate for pest management, a comparison of heat units required in the laboratory and estimates in the field are necessary.

Unlike the results obtained by Hosni et al. (2011) on *B. zonata* at 25 °C (male/female = 1: 1), our results found a sex ratio significantly biased toward females at the same temperature and using *C. capitata* as host.

We conclude that *A. daci* could be recommended as a natural enemy in a *sensu stricto* biological control programme. Likewise, *A. daci* may also be useful in biocontrol projects through both inundative and inoculative releases, although primarily through inundative releases at appropriate times and even using the parasitoid in hotspot control. However, in both cases temperature should be taken into account as extreme hot and cold temperatures may hinder effective control. Despite its usefulness as a biological control agent, *A. daci* cannot be expected to achieve a total and natural biological control of *C. capitata*.

References

- Andleeb, S., Shahid, M.S., Mehmood, R., 2010. Biology of parasitoid *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Eucoilidae). Pak. J. Sci. Ind. R. 53, 201–204.
- Baranowski, R., Glenn, H., Sivinski, J., 1993. Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Fla Entomol. 76, 245–251.
- Blackburn, T.M., 1991a. A comparative examination of lifespan and fecundity in parasitoid Hymenoptera. J. Anim. Ecol. 60, 151–164.
- Blackburn, T.M., 1991b. Evidence for a 'fast-slow' continuum of life-history traits among parasitoid Hymenoptera. Funct. Ecol. 5, 65–74.
- Campbell, A., Frazer, B.D., Gilbert, N., Gutiérrez, A.P., Mackauer, M., 1974. Temperature requirements of some aphids and their parasites. J. Appl. Ecol. 11, 431–438.
- Clausen, C.P., Clancy, D.W., Chock, Q.C., 1965. Biological control of the Oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. U. S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1322, 1–102.

- Clausen, C.P., 1978. Introduced Parasites and Predators of Arthropod Pests and Weeds: a World Reviews. U.S. Department of Agricultural Handbook, N. 480, pp. 320–335.
- de Pedro, L., Harbi, A., Ferrara, F.A., Tormos, J., Verdú, M.J., Sabater-Muñoz, B., Beitia, F., 2013. Parasitismo generado por *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae), parasitoide de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), en condiciones climáticas mediterráneas. In: VIII Congreso Anual de Entomología Aplicada. XIV Jornadas Científicas de la SEEA. October 21–15. Mataró (Barcelona, Spain).
- Duyck, P.F., Sterlin, J.F., Quilici, S., 2004. Survival and development of different life stages of *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae) reared at five constant temperatures compared to other fruit fly species. B. Entomol. Res. 94, 89–93.
- El-Heneidy, A.H., Ramadan, M.M., 2010. *Bactrocera zonata* (Saunders) status and its natural enemies in Egypt. In: 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. September 26 to October 1, 2010, Valencia, Spain.
- Fernandes-Da-Silva, P.G., Zucoloto, F.S., 1993. The influence of host nutritive value on the performance and food selection in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Insect. Physiol. 39, 883–887.
- Garzón-Luque, E., Beitia, F., Falcó, J.V., 2008. Parasitism of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) on the host *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) under mediterranean temperatures. IOBC/WPRS Bull. 38, 125–129.
- Herard, F., Keller, M.A., Lewis, W.J., 1988. Rearing *Microplitis demolitor* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) in the laboratory for use in studies of semiochemical mediated searching behaviour. J. Entomol. Sci. 23, 105–111.
- Hosni, M.E., El-Husseini, M.M., El-Heneidy, A.H., Atallah, F.A., 2011. Biological aspects of the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saund.) (Diptera: Tephritidae) and its parasitoid species, *Aganaspis daci* Weld. (Hymenoptera: Eucolidae). Egypt J. Biol. Pest Co. 21, 137–142.
- Jervis, M.A., 2005. Insects as Natural Enemies: a Practical Perspective. Springer, Dordrecht.
- Karamouna, F., Mylonas, P., Parachristis, B., Kontodimas, D., Michaelakis, A., Kapaxidi, E., 2010. Main Arthropods Pests of Citrus Culture and Pest Management in Greece. In: Ciancio, A. and Makerji, K.G. (Eds.), Integrated Management of Arthropod Pests and Insect Borne Diseases. Springer, Netherlands, pp. 29–50.

- Krishnamoorthy, A., 1989. Effect of cold storage on the emergence and survival of the adult exotic parasitoid, *Leptomastix dactylopii* How. (Hym., Encyrtidae). Entomon 14, 313–318.
- Liu, Y.H., Tsai, J.H., 2002. Effect of temperature on development, survivorship, and fecundity of *Lysiphlebia mirzai* (Hymenoptera: Aphidiidae), a parasitoid of *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae). Environ. Entomol. 31, 418–424.
- Malina, R., Praslička, J., 2008. Effect of temperature on the developmental rate, longevity and parasitism of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). Plant Prot. Sci. 44, 19–24.
- Martínez-Torres, R., 2011. Determinación de la Eficacia de *Aganaspis daci* (Weld, 1951) como agente de Control Biológico de *Ceratitis capitata* (Wiedemann), la Mosca Mediterránea de la Fruta. Trabajo de Fin de Carrera. Ingeniero Agrónomo. Universidad Politécnica de Valencia.
- McDougall, S.J., Mills, N.J., 1997. The influence of hosts, temperature and food sources on the longevity of *Trichogramma platneri*. Entomol. Exp. Appl. 83, 195–203.
- Núñez-Bueno, L., 1982. *Trybliographa daci* Weld (Hymenoptera: Cynipidae): Biology and Aspects of the Relationship with its Host *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad de Florida, Gainesville, USA.
- Ovruski, S.M., 1994. Immature stages of *Aganaspis pelleranoi* (Brethes) (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae), a parasitoid of *Ceratitis capitata* (Wied.) and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). J. Hymenopt. Res. 3, 233–239.
- Papadopoulos, N.T., Katsoyannos, B.I., 2003. Field parasitism of *C. capitata* larvae by *Aganaspis daci* in Chios, Greece. Biocontrol 48, 191–195.
- Pérez-Hinarejos, M., Beitia, F., 2008. Parasitism of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera, Pteromalidae), an idiobiont parasitoid on pupae of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). IOBC/WPRS Bull. 38, 130–133.
- Rivero, A., West, S.A., 2002. The physiological costs of being small in a parasitic wasp. Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 8388–8392.

- Sabater-Muñoz, B., Falcó, J.V., de Pedro, L., Tormos, J., Asís, J.D., Papadopoulos, N.T., Verdú, M.J., Beitia, F., 2012. First record, surveillance and biological parameters of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), as parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Spain. In: Second International Symposium of TEAM (Tephritid Workers of Europe Africa and the Middle East). Kolymbari, Crete (Greece), July 2–6.
- Seal, D.R., Stansly, P.A., Schuster, D.J., 2002. Influence of temperature and host on life history parameters of *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environ. Entomol.* 31, 354–360.
- Szyniszewska, A.M., Tatem, A.J., 2014. Global assessment of seasonal potential distribution of mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE* 9, e111582. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111582>.
- Tormos, J., Asís, J.D., Sabater-Muñoz, B., Baños, L., Gayubo, S.F., Beitia, F., 2012. Superparasitism in laboratory rearing of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of medfly (Diptera: Tephritidae). *B. Entomol. Res.* 102, 51–61.
- Tormos, J., de Pedro, L., Beitia, F., Sabater-Muñoz, B., Asís, J.D., Polidori, C., 2013. Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in *Aganaspis* parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies. *Microsc. Microanal.* 19, 1475–1489.
- Weld, L.H., 1951. A new species of *Trybliographa* (Hymenoptera: Cynipidae). *Proc. Hawaii. Entomol. Soc.* 14, 331–332.
- Wharton, R.A., Gilstrap, F.E., Rhodei, R.H., Fischel, M.M., Hart, W.G., 1981. Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Costa Rica. *Entomophaga* 26, 285–290.
- Wysoki, M., de Long, M., Rene, S., 1988. *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae), its biology and ability to search for eggs of two lepidopterous avocado pests, *Boarmia (Ascotis) selenaria* (Schifferrmuller) (Geometridae) and *Cryptoblabe gnidiella* (Milliere) (Phycitidae) in Israel. *Colloq. INRA* 43, 295–301.

CAPÍTULO 4

“Biology of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): mode of reproduction, biological parameters and superparasitism”

Biología de *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), parasitoide de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): tipo de reproducción, parámetros biológicos y superparasitismo

Luis de Pedro, Francisco Beitia, Beatriz Sabater-Muñoz, Josep Daniel Asís, José Tormos

Una versión de este capítulo ha sido enviada para su publicación:

de Pedro, L., Beitia, F., Sabater-Muñoz, B., Asís, J. D., Tormos, J. 2017. Biology of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): mode of reproduction, biological parameters and superparasitism.

Resumen: Los parámetros biológicos de los himenópteros parasitoides tienen un efecto decisivo sobre la capacidad de estos insectos de actuar como agentes de control biológico. En este estudio se evaluaron, bajo condiciones de laboratorio, el tipo de reproducción, varios parámetros biológicos en función del emparejamiento o “mating” (tales como longevidad, fertilidad, porcentaje de parasitismo, mortalidad inducida y reducción poblacional) y el superparasitismo del parasitoide *Aganaspis daci* (Weld) sobre larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Los resultados mostraron que el tipo de reproducción de esta especie es la haplodiploidía arrenotoca, con hembras no emparejadas que sólo producen machos y hembras emparejadas que dan lugar a una descendencia cuya razón sexual se desplaza hacia las hembras ($\frac{\text{♀♀}}{\text{♀♀}+\text{♂♂}} = 0.73$) desde su primer día de vida. Además se vio que el emparejamiento tenía un efecto significativamente negativo sobre la longevidad (14–22 días), sin diferencias significativas en fertilidad, porcentaje de parasitismo, mortalidad inducida o reducción poblacional entre hembras emparejadas y no emparejadas. También se apreció un fuerte efecto de la edad de la hembra sobre la fertilidad y el porcentaje de parasitismo, con ambas variables decreciendo a medida que aumentaba la edad de la hembra y un patrón de oviposición similar entre hembras emparejadas y no emparejadas. Respecto al superparasitismo, nuestros resultados demuestran la existencia de este fenómeno en esta especie de parasitoide, con un efecto significativamente negativo de la abundancia de hospedador y significativamente positivo de la abundancia de hembras conespecíficas sobre la tasa de superparasitismo. La existencia de auto-superparasitismo se confirmó para hembras que actuaban solas, mientras que la agregación de hembras llevó a una mayor intensidad (hasta 8 huevos por pupa del hospedador) y porcentaje de, presumiblemente, superparasitismo conespecífico. La información aquí reportada acerca de varios aspectos biológicos de *A. daci* sobre *C. capitata* apoya el uso de este parasitoide en

programas de control biológico contra la mosca mediterránea de la fruta, y resalta la importancia de varios factores, tales como la razón sexual o el índice “parasitoide/hospedador” existentes bajo las condiciones de cría o campo, a la hora de planear la cría masiva o la liberación en campo del parasitoide.

A version of this chapter has been submitted for publication:

de Pedro, L., Beitia, F., Sabater-Muñoz, B., Asís, J. D., Tormos, J. 2017. Biology of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): mode of reproduction, biological parameters and superparasitism.

Abstract: Biological parameters of parasitoid wasps have a decisive effect on their effective performance as biological control agents. The mode of reproduction, several biological parameters (such as longevity, fertility, percentage parasitism, induced mortality and population reduction) depending on mating, and superparasitism of the parasitoid *Aganaspis daci* (Weld) infesting larvae of the medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) were assessed under laboratory conditions. Results indicated an arrhenotokous haplodiploidy mode of reproduction, with unmated females producing only males and mated females producing a female-biased offspring ($\frac{\text{♀♀}}{\text{♀♀}+\text{♂♂}} = 0.73$) from its first day of life. Additionally, mating status showed a significant negative effect on longevity (14–22 days), with no significant differences on fertility, percentage parasitism, induced mortality or population reduction between mated and unmated females. A strong effect of the age of females on fertility and percentage of parasitism was also reported, with both variables decreasing as female age increased and a similar oviposition pattern for mated and unmated females. Concerning superparasitism, our findings showed the occurrence of this phenomenon in this parasitoid species, with a significant negative effect of host abundance and a significant positive effect of parasitoid (conspecific females) abundance on superparasitism rate. The existence of self-superparasitism was confirmed for females acting alone, whilst female aggregation led to a higher intensity (up to 8 eggs/host pupa) and percentage of, presumably, conspecific superparasitism. The information reported here on several biological aspects of *A. daci* infesting *C. capitata* supports the use of this parasitoid in biological control programmes against medfly, and highlights the importance of several factors, such as the sex ratio or the parasitoid/host ratio existing under rearing and field conditions, when planning the mass production and field releases of this parasitoid.

Keywords: Medfly; *Aganaspis daci*; Reproduction; Biological parameters; Mating; Superparasitism.

CAPÍTULO 5

**“Parasitism of *Aganaspis daci* against *Ceratitis capitata* under
Mediterranean climate conditions”**

Parasitismo de *Aganaspis daci* sobre *Ceratitis capitata* bajo condiciones climáticas mediterráneas

Luis de Pedro, Francisco Beitia, Beatriz Sabater-Muñoz, Ahlem Harbi, Fernando Ferrara, Carlo Polidori, Josep Daniel Asís, José Tormos



Entomologia Experimentalis et Applicata 163 (2017) 287–295

Factor de impacto (2016): 1.162


ISSN: 0013-8703 (Impreso), 1570-7458 (Online)

Resumen: El efecto de los factores ambientales es decisivo en el éxito de los parasitoides como agentes de control biológico, ya que afecta a su capacidad de búsqueda de hospedadores, a su desarrollo y a su supervivencia. En este sentido, se sabe que el parasitoide larvo-pupal *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae) muestra una fertilidad (es decir, una producción de descendencia) muy baja en campo en ciertas áreas mediterráneas, lo cual podría deberse a su incapacidad para ovipositar eficientemente bajo dichas condiciones climáticas. En este estudio, se valoraron el porcentaje de parasitismo y la mortalidad inducida (mortalidad de pupas del hospedador atribuida a los parasitoides, pupas de las que no emergen individuos adultos) mostrados por este himenóptero sobre la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), bajo condiciones de campo, a lo largo de un año natural, y utilizando manzanas artificialmente infestadas con larvas de este díptero y liberaciones confinadas del parasitoide en una parcela de limoneros del Este español. Debido a que, por estudios previos, se sabe que *A. daci* produce muy pocas emergencias en el campo, la fertilidad se midió en el laboratorio a partir de pupas parasitadas recuperadas del campo. Se hallaron tasas de parasitismo del 27% y altas tasas de mortalidad inducida, con un promedio del 66%, bajo condiciones de campo. Consecuentemente, la reducción poblacional de la plaga (mortalidad total de *C. capitata* causada por *A. daci*, es decir, mortalidad inducida + porcentaje de parasitismo) fue, en promedio, del 87%. El porcentaje de parasitismo y la mortalidad inducida variaron a lo largo del año en función de la temperatura media y la humedad relativa. La interacción de estos factores llevó a que las tasas de parasitismo más altas se obtuviesen frente a bajas temperaturas y humedades medias; del mismo modo, los porcentajes más altos de mortalidad inducida fueron obtenidos con una combinación de altas temperaturas medias y bajos valores de humedad media. En resumen, *A. daci* puede tener un impacto considerable

sobre las poblaciones de mosca mediterránea de la fruta, siendo un buen candidato a la hora de realizar sueltas inundativas en campo para el manejo de *C. capitata* en la cuenca mediterránea.



Parasitism of *Aganaspis daci* against *Ceratitis capitata* under Mediterranean climate conditions

Luis de Pedro^{1,2,*} , Francisco Beitia², Beatriz Sabater-Muñoz^{2,3}, Ahlem Harbi^{2,4}, Fernando Ferrara^{2,5}, Carlo Polidori⁶, Josep Daniel Asís¹ & José Tomos¹

¹Facultad de Biología, Unidad de Zoología, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain, ²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial, Montcada, 46113 Valencia, Spain, ³Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublin, Ireland, ⁴Institut Supérieure Agronomique de Chott-Mériem, Université de Sousse, 4042 Chott-Mériem, Tunisia, ⁵Instituto Federal Fluminense (IFF), Campus Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, Brazil, and ⁶Instituto de Ciencias Ambientales (ICAM), Universidad de Castilla-La Mancha, Avenida Carlos II, s/n, E-45071 Toledo, Spain

Abstract: The effect of environmental factors is essential to the success of parasitoids as biological control agents, as it determines their foraging activity, development, and survival. The larval-pupal parasitoid wasp *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae) is known to have a very low fertility (i.e., offspring production) in the field in certain Mediterranean areas, probably due to its inability to efficiently oviposit under such climatic conditions. In this study, the percentage of parasitism and induced mortality (mortality of host pupae attributed to parasitoids, from which adults do not emerge) caused by this wasp to the Mediterranean fruit fly (medfly), *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), were assessed under field conditions across 1 year, using medfly-infested apples and parasitoid-confined release in a lemon orchard of southeastern Spain. As *A. daci* is known to have very few emergences in the field, fertility was assessed in the laboratory from parasitized pupae recovered from the field. We found average parasitism rates of 27% and high induced mortality rates of 66% under field conditions. Consequently, medfly population reduction (total mortality of *C. capitata* caused by *A. daci*, i.e., induced mortality + % parasitism) was, on average, 87%. Parasitism and induced mortality varied throughout the year, depending on the average temperature and relative humidity. The interaction of these factors resulted in the highest parasitism rates at low mean temperature and humidity values; likewise, the highest percentages of induced mortality were obtained with a combination of high mean temperature and low mean humidity values. In conclusion, *A. daci* may exert a strong impact on medfly populations, being a good candidate for inundative field releases for the management of *C. capitata* in the Mediterranean Basin.

Key words: Hymenoptera, Figitidae, parasitoid, Diptera, Tephritidae, medfly, biological control, induced mortality, population reduction, temperature, humidity.

1. Introduction

Currently, the Mediterranean fruit fly or medfly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), is one of the main global threats to fruit trees and citrus, with a range of more than 330 plant host species and known to be capable of adapting to a wide range of climates (Liquido et al., 1991; Papadopoulos, 2008). Control programmes against *C. capitata* are essential due to the negative economic effects of this species. The control strategies most used are environmentally friendly methods, such as sterile insect technique (SIT), mass trapping, chemosterilant traps, or biological control through the use of parasitoids (Delrio & Cocco, 2012).

Among the parasitoids of medfly, *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae), a larval-pupal solitary primary endoparasitoid, is one of the most promising species for biological control of medfly. This species was first recorded in 1951 as a larval parasitoid of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (= *Dacus dorsalis*) in Malaysia and Taiwan (Weld, 1951). Since then, it has been introduced into several countries to control tephritid species (Clausen, 1978; Wharton et al., 1981; El-Heneidy et al., 2014). However, although this wasp was proved to be effective against various species of fruit flies (Baranowski et al., 1993; Ovruski et al., 2000, 2007), its potential as control agent against *C. capitata* is still not fully clear, mostly because of scarcity of data from many areas and different medfly fruit hosts. *Aganaspis daci* was found to attack medfly in Greece in fig fruits (Papadopoulos & Katsoyannos, 2003), in Syria in loquat, guava, peach, and grapefruit (Ali et al., 2015, 2016), and in Spain in fig and citrus fruits (Verdú et al., 2011; Sabater-Muñoz et al., 2012). It also developed successfully from medfly-infested apples in controlled experiments in Spain (de Pedro et al., 2017).

Particularly unclear is whether *A. daci* can be effective in controlling medfly in the Mediterranean Basin. Indeed, despite high rates of parasitism (50–90%) recorded both in Greece and in Spain (Papadopoulos & Katsoyannos, 2003; Verdú et al., 2011; Sabater-Muñoz et al., 2012), this wasp is known to have a very low fertility (i.e., offspring production) in the field, compared with other parasitoids of *C. capitata* (Beitia et al., 2007; Garzón-Luque et al., 2008; Pérez-Hinarejos & Beitia, 2008; Stacconi et al., 2013; Harbi et al., 2014) in Mediterranean areas. The causes of this phenomenon are not clear, but one possibility is that *A. daci* is unable to efficiently oviposit under certain climatic conditions.

Here, we aimed to establish the influence of Mediterranean climate conditions on *A. daci* parasitic potential, by analysing the effects of these conditions on the percentage of parasitism (= parasitism rate, as the number of descendants produced by parasitoids per recovered pupa), induced mortality [as the mortality (i.e., pupae that remain closed) due to

parasitoid activity], and population reduction (as the sum of induced mortality + % parasitism) in this parasitoid on *C. capitata*.

2. Materials and methods

2.1. Experimental area and insect rearing

The assays were conducted in a lemon orchard located in the experimental field at the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Valencia, Spain) throughout a 1-year period (between 2012 and 2013). IVIA initiated in 2003 an Integrated Plan of Action against *C. capitata* in the Valencian Region (Comunidad Valenciana, Spain), which aims to include both exotic parasitoids (Beitia et al., 2003, 2011; Falcó et al., 2003) and native or naturalized parasitoids (Falcó et al., 2006). The latter group includes *A. daci*, for which IVIA established a rearing routine in 2010 in order to evaluate its efficacy as a biological control agent of medfly. This parasitoid was recovered for the first time in this area from medfly larvae recovered from fig and citrus fruits in the summer of 2009 in Valencia (Sabater-Muñoz et al., 2012). Since 2011 many experiments have been performed to increase our knowledge of the biology, ecology, and parasitic activity of this species (de Pedro et al., 2013a, 2016, 2017; Tormos et al., 2013).

Ceratitis capitata and its parasitoid *A. daci* were reared in separated climatic chambers at IVIA. Medfly was reared at 27 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ r.h., and L16:D8 photoperiod; the parasitoid was reared at 24 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ r.h., and L16:D8.

2.2. Experimental protocol

To evaluate the parasitism ability of *A. daci* against *C. capitata* under Mediterranean climate conditions, a total of 13 assays were conducted in 1 year, from May 2012 to May 2013. The assays covered the climatic conditions corresponding to the four seasons. Twenty-six apples (var. Royal Gala) were artificially infested according to Martins et al. (2010), with 30 second or third medfly instars in each assay – 10 holes (8 mm diameter, 2 cm deep) were dug in each fruit and three larvae were deposited in each hole. Apples were individually confined in a plastic ventilated cylinder (15 × 20 cm), with a total of 26 cylinders; five couples of parasitoids were introduced into 20 of them (this parasitoid/host ratio does not lead to high superparasitism rates, as observed by the authors), whereas the other six cylinders, without parasitoids, were considered as control treatments to assess the natural medfly larva mortality.

All cylinders, referred to as parasitism units, were introduced into wood-framed mesh cages and placed under lemon trees (to provide shelter from rain, avoiding the possible damages caused by rain). All cylinders were kept in place in the field for 1 week to obtain parasitism by female wasps. After that, medfly pupae were collected from the cylinders, in which a layer of

vermiculite had been placed previously in order to provide the larvae with a suitable substratum to pupate. Depending on the conditions for the development of immature stages, two treatments were considered, referred to as (1) laboratory and (2) field series.

Laboratory series: as *A. daci* is known to have a very low fertility (i.e., offspring production) in the field in some Mediterranean areas, pupae recovered from half of the cylinders (10 cylinders containing parasitoids + three controls) were put in translucent plastic boxes (20 × 15 × 10 cm) – one translucent plastic box per cylinder – and transferred to laboratory conditions (25 ± 2 °C, 50-70% r.h., L16:D8 photoperiod) to develop under optimal conditions and to recover medfly and parasitoid adults. The adult parasitoids obtained enabled us to determine the climatic effects on the parasitic activity of *A. daci* under natural conditions. Medfly and parasitoid emergences and closed puparia were counted, and % parasitism and induced mortality were analysed. Induced mortality was evaluated by comparing % mortality in the treatment with % mortality in its control. Induced mortality (=corrected mortality) was calculated using the Schneider-Orelli formula (Püntener, 1981) as follows:

$$\text{Induced mortality (\%)} = [(\text{Treatment mortality} - \text{Control mortality}) / (100 - \text{Control mortality})] \times 100\%$$

Induced mortality is difficult to determine, but certainly includes oviposition (thus, related with parasitism) and other types of parasitoid behaviour unrelated with parasitism (e.g., host feeding).

Field series: from the other half of the cylinders (10 cylinders containing parasitoids + three controls), pupae were recovered and put in the same type of translucent plastic boxes, now placed inside another wooden-framed mesh cage, placed under a lemon tree, in the abovementioned lemon orchard. These plastic boxes were kept in the field until parasitoids emerged or alternatively until collection as closed pupae after a maximum of 4 months, to assess the effect of climatic conditions on *C. capitata* population reduction. Medfly and parasitoid emergences and closed puparia were counted to estimate % parasitism, induced mortality and, consequently, the within-year variation in medfly population reduction. In this case, induced mortality was evaluated by comparing % mortality with the laboratory control.

To establish the climatic conditions of each assay, six environmental variables were measured. Temperature and relative humidity were recorded once every hour of the day by a data logger placed in one of the wooden cages with the cylinders. The other environmental factors were number of sunshine hours, number and sum of cold hours [i.e., temperature below 8.5 °C, the minimum threshold for *A. daci*; the threshold for *C. capitata* is 10 °C (Szyniszewska & Tatem, 2014; de Pedro et al., 2016)], solar radiation (MJ m⁻²) and rainfall (mm). These were

obtained on a daily basis from the weather station at IVIA near the study plot [Model 2 of the agroclimatic information system for irrigated cultures (SiAR) of the Ministry of Agriculture, Food and Environment]. The mean values of all climatic variables across the assay periods (i.e., weeks) were used in the analysis. Each assay therefore corresponded to a particular climatic condition, as the environmental factors were different for each assay but identical across repetitions within assays (see Results).

2.3. Statistical analysis

ANOVA was performed to test the effect of the season of the year on the dependent variables % parasitism, % induced mortality, and % population reduction, followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) tests for comparisons among seasons. Multiple linear regressions were used to analyse the possible effect of environmental factors and their interactions on dependent variables. Maximal models were simplified by manual stepwise backward selection ($\alpha = 0.05$). To avoid introducing correlated environmental factors in the regression model, we conducted an exploratory principal component analysis (McGarigal et al., 2000; Jackson, 2003) with the correlation matrix, calculated from the mean of the values obtained in each assay. When necessary the variables were normalized and the values (continuous variables) between 0 and 100 rescaled prior to analysis. In addition, the distributions of residuals were tested for normality. Analyses were performed with the SPSS v.20 statistical package (IBM SPSS, Armonk, NY, USA).

3. Results

Mean parasitism per assay across the 13 study periods ranged from 5 to 49%, on average (mean \pm SE =) $27.4 \pm 13.2\%$ (Table 1). Season had a strong effect on % parasitism ($F_{3,126} = 7.94$, $P < 0.001$). Parasitism in autumn and winter was higher than in spring, and in winter it was higher than in summer (Tukey's HSD test: $P < 0.05$).

Mean induced mortality rate per assay across the 13 study periods ranged from 31 to 94%, on average $65.8 \pm 18.4\%$ (Table 1). Season had a strong effect on % induced mortality ($F_{3,126} = 8.97$, $P < 0.001$). Induced mortality was lower in winter than in spring, summer, or autumn (Tukey's HSD test: $P < 0.05$).

The multiple linear regression model indicated a significant effect of mean temperature (MT) and mean humidity (MH) (through its interaction with mean temperature) on % parasitism ($R^2_{aj} = 0.59$, $AIC = -61.07$, $F_{3,9} = 6.91$, $P = 0.011$) (Figure 1). These factors would influence the response of % parasitism according to the following equation:

$$\% \text{ parasitism} = 1.37 - 0.0761 \times MT - 0.0116 \times MH + 0.000854 \times MT * MH$$

In particular, % parasitism of *A. daci* increased as MT increased but only with high levels of MH; with moderate and low levels of MH, increases in MT induced a reduction in % parasitism (Figure 1).

The multiple linear regression model for the effects of environmental factors on induced mortality also indicated a significant effect of both MT and MH, together with their interaction, on the dependent variable ($R^2_{aj} = 0.77$, AIC = 60.24, $F_{3,9} = 14.01$, $P = 0.001$) (Figure 2). These factors would condition the response of the induced mortality according to the following equation:

$$\% \text{ induced mortality} = -127.16 + 12.03 \times MT + 2.23 \times MH - 0.141 \times MT*MH$$

Thus, the induced mortality increased as MT increased for low and moderate values of MH, but decreased with temperature when MH was high (Figure 2).

Mean population reduction per assay across the 13 study periods ranged from 73 to 97%, on average (mean \pm SE =) $86.7\% \pm 7.1\%$ (Table 2). Although this variable was high throughout the study, between-season differences were apparent ($F_{3, 126} = 3.32$, $P = 0.02$). Population reduction was lower in spring than in summer (Tukey's HSD test: $P < 0.05$).

Table 1. Mean (\pm SE) climatic conditions of each assay in the laboratory series.

Assay ¹	Season	Period	Temperature (°C)		Humidity (%)		No. sunshine hours	No. hours of cold ³	Solar radiation (MJ m ⁻²)	Rainfall (mm)	% parasitism	% induced mortality ⁴
			Mean \pm SE (range)	CV ²	Mean \pm SE (range)	CV ²						
1	Spring	18 May 2012	21.6 \pm 8.4 (12.7–35.6)	18.0	55.8 \pm 41.1 (13.5–99.4)	28.0	12.5	0	25.9	0.08	6 \pm 2.13	89.2 \pm 2.90
2		13 June	23.3 \pm 9.0 (14.4–32.5)	20.1	70.1 \pm 38.5 (30.7–100)	32.0	12.3	0	25.2	0.5	5 \pm 2.21	93.6 \pm 3.07
3	Summer	27 June	26.5 \pm 9.9 (16.2–38.1)	21.0	70.3 \pm 40.1 (28.8–99.8)	29.6	12.3	0	23.1	0	21 \pm 4.06	76.8 \pm 4.11
4		22 August	27.8 \pm 8.9 (19.9–39.7)	17.0	81.7 \pm 52.2 (21.3–100)	27.1	11.9	0	22.5	0	22 \pm 5.37	76.7 \pm 5.44
5		6 September	24.4 \pm 7.8 (16.8–34.7)	24.9	87.3 \pm 49.2 (35.4–100)	25.0	10.7	0	19.4	0	39 \pm 7.14	58.0 \pm 6.76
6	Autumn	27 September	19.9 \pm 8.0 (13.1–31.1)	18.3	82.8 \pm 53.1 (22.8–99.3)	10.7	8.3	0	11.4	4.8	30 \pm 6.49	68.0 \pm 6.24
7		10 October	20.3 \pm 10.1 (10.3–34.5)	29.0	68.0 \pm 48.1 (19.9–97.8)	37.2	9.1	0	13.4	0.8	19 \pm 3.99	77.8 \pm 4.96
8		25 October	14.3 \pm 11.3 (3.0–27.6)	36.5	89.2 \pm 59.6 (22.0–99.7)	17.8	8.3	3.2	11.1	0.5	27 \pm 3.03	70.3 \pm 3.66
9		28 November	9.2 \pm 9.2 (0.1–20.6)	50.2	65.2 \pm 36.0 (29.0–99.0)	30.5	7.8	8.4	9.5	0	49 \pm 7.41	30.5 \pm 6.19
10	Winter	23 January 2013	12.3 \pm 11.8 (1.0–24.9)	42.4	49.4 \pm 35.1 (16.5–98.9)	38.1	8.2	6.3	10.6	0.04	43 \pm 3.16	49.1 \pm 3.84
11		6 February	10.7 \pm 7.6 (2.5–21.8)	34.9	41.1 \pm 25.5 (18.2–73.9)	33.3	8.8	6.5	11.1	0.01	36 \pm 4.48	37.8 \pm 4.90
12	Spring	27 March	18.5 \pm 10.1 (8.6–29.8)	22.2	50.0 \pm 32.7 (18.3–99.7)	36.8	10.3	0.1	19.3	0.03	25 \pm 6.50	72.2 \pm 6.58
13		8 May	18.5 \pm 10.6 (12.0–41.2)	32.0	73.9 \pm 43.5 (22.8–99.9)	34.5	11.7	0	23.3	0.7	35 \pm 7.33	60.6 \pm 7.35

¹Duration of each assay was 1 week.

²CV, coefficient of variation (= relative standard deviation, RSD).

³Hours with temperature below 8.5 °C, the minimum threshold of *Aganaspis daci*.

⁴Corrected mortality [= [(treatment mortality – control mortality) / (100 – control mortality)] \times 100%].

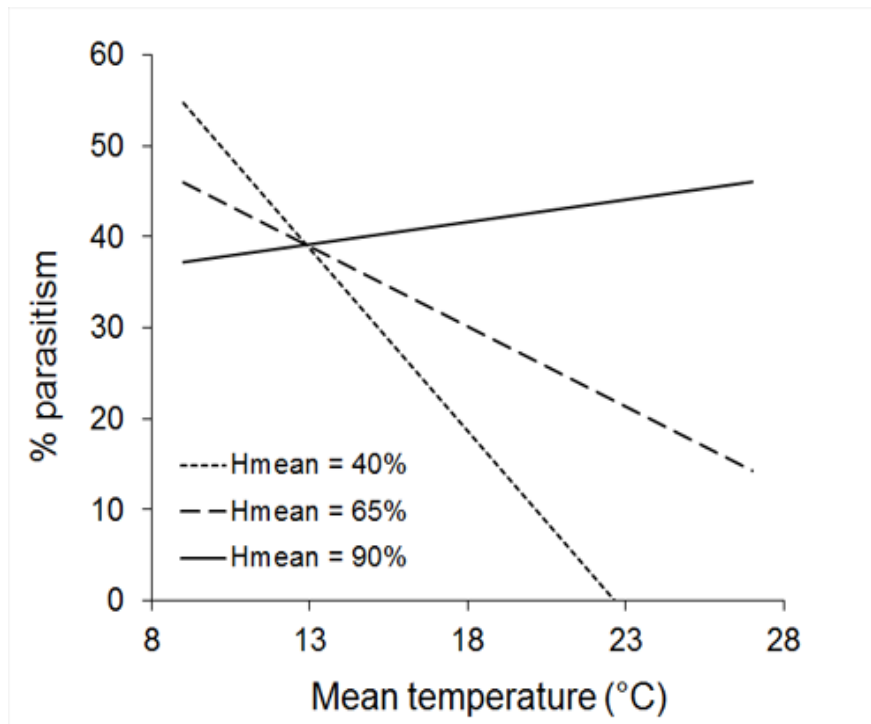


Figure 1. Relationship between parasitism (%) and mean temperature (°C), for high (90%), moderate (65%), and low (40%) mean humidity (Hmean). Notice how % parasitism of *Aganaspis daci* decreases as temperature increases when mean humidity is moderate or low; when mean humidity is high % parasitism increases as temperature increases.

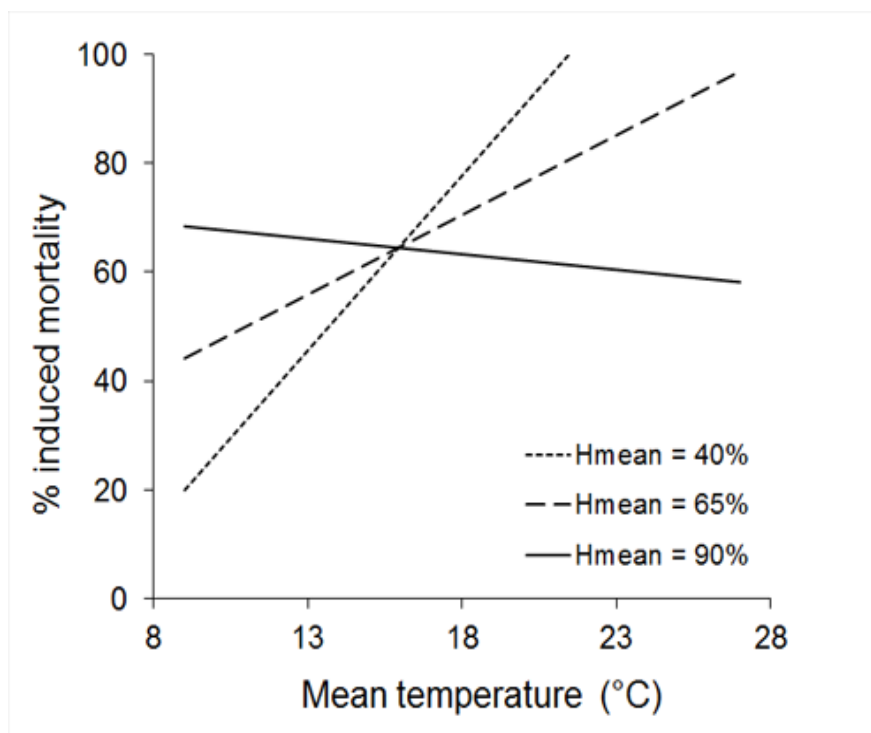


Figure 2. Relationship between induced mortality (%) and mean temperature (°C), for high (90%), moderate (65%), and low (40%) mean humidity (Hmean). Notice how induced mortality of *Aganaspis daci* increases with temperature when mean humidity is low or moderate, and how it decreases with temperature when mean humidity is high.

Table 2. Mean (\pm SE) climatic conditions of each assay in the field series.

Assay ¹	Season	Period	Temperature ($^{\circ}$ C)		Humidity (%)		No. sunshine hours	No. hours of cold ³	Solar radiation (MJ m ⁻²)	Rainfall (mm)	% population reduction
			Mean \pm SE (range)	CV ²	Mean \pm SE (range)	CV ²					
1	Spring	18 May 2012	25.3 \pm 8.5 (17.1–34.5)	24.2	60.2 \pm 27.5 (32.8–88.3)	37.5	13.0	0	28.2	0.1	80.1 \pm 3.46
2		13 June	26.2 \pm 7.1 (19.3–33.9)	20.1	68.6 \pm 28.6 (36.3–96.1)	34.7	12.9	0	27.4	0.06	72.5 \pm 0.00
3	Summer	27 June	27.2 \pm 7.7 (19.6–35.5)	20.9	63.7 \pm 28.4 (34.4–92.3)	35.9	13.1	0	27.8	0	90.5 \pm 0.74
4		22 August	27.3 \pm 7.1 (20.6–35.1)	71.8	71.8 \pm 26.7 (39.9–97.1)	33.4	12.8	0	26.7	0	86.0 \pm 3.94
5		6 September	22.2 \pm 5.2 (17.6–29.4)	24.3	83.2 \pm 20.5 (57.8–94.7)	25.9	9.6	0	14.3	1.8	96.5 \pm 0.01
6	Autumn	27 September	19.7 \pm 6.8 (13.8–28.6)	30.6	77.2 \pm 29.1 (22.8–99.3)	26.4	8.9	0.4	13.2	1.0	93.0 \pm 0.91
7		10 October	14.6 \pm 4.7 (10.2–20.8)	35.6	79.5 \pm 29.6 (54.7–96.1)	25.3	6.9	1.6	8.6	0.9	91.7 \pm 0.01
8		25 October	12.7 \pm 4.6 (8.7–18.8)	39.7	86.7 \pm 22.1 (48.3–98.6)	49.9	6.9	3.4	7.3	2.1	90.2 \pm 0.44
9		28 November	11.9 \pm 4.4 (7.0–18.2)	40.6	60.2 \pm 29.4 (35.0–83.9)	37.9	12.9	7.2	14.6	1.6	75.1 \pm 4.45
10	Winter	23 January 2013	15.7 \pm 9.0 (8.8–30.8)	45.1	65.1 \pm 27.3 (24.1–92.9)	40.6	10.6	2.2	19.5	1.8	83.2 \pm 2.60
11		6 February	20.9 \pm 8.1 (12.4–30.3)	28.5	53.3 \pm 29.1 (35.6–85.3)	33.1	12.1	0	26.9	0.2	88.4 \pm 2.90
12	Spring	27 March	16.7 \pm 5.2 (12.9–27.4)	32.6	78.2 \pm 21.4 (57.9–94.9)	24.4	6.9	0.4	11.2	1.0	90.3 \pm 0.34
13		8 May	22.2 \pm 5.1 (17.6–29.4)	24.3	83.2 \pm 17.8 (64.4–94.9)	25.9	9.6	0	14.4	1.9	89.7 \pm 0.00

¹Duration of each assay was until emergence of hosts and parasitoids, at least 1 month.

²CV, coefficient of variation (= relative standard deviation, RSD).

³Hours with temperature below 8.5 $^{\circ}$ C, the minimum threshold of *Aganaspis daci*.

4. Discussion

Temperature and humidity, and most likely their interaction, are known to affect parasitism parameters of parasitoids, such as developmental time, longevity, number of oocytes, fecundity, and parasitism rate (Kalyebi et al., 2006; Emaná, 2007; Bruce et al., 2009; Quicke, 2015). Given their generally small size and, thus, their risk of water loss, humidity can also influence foraging activity of parasitoids and consequently parasitism rate (Moezipour et al., 2008; Quicke, 2015), particularly under hot conditions. *Aganaspis daci* appears no exception, although very few earlier studies addressed the effects of climatic conditions on its parasitism rate in the field – the strong dependence of its larval development upon environmental factors was already known (Andleeb et al., 2010; Hosni et al., 2011; de Pedro et al., 2016).

Under Mediterranean climate conditions, *A. daci* exhibited very low fertility compared to other parasitoids of *C. capitata*, such as the braconids *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Harbi et al., 2014) and *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Garzón-Luque et al., 2008), and the pteromalids *Spalangia cameroni* Perkins and *Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani) (Beitia et al., 2007; Pérez-Hinarejos & Beitia, 2008; Stacconi et al., 2013). According to these studies, although winter and summer temperatures seem to affect the immature development of all five species, *A. daci* presents higher immature mortality than the other four species throughout the year. Both high (30–35 °C) and low (ca. 15 °C) temperatures lead to slow development and poor offspring survival in this parasitoid (de Pedro et al., 2016). One hypothesis is that the low fertility of *A. daci* is due to its inability to oviposit effectively under field climatic conditions. This contrasts with the results of Papadopoulos & Katsoyannos (2003) and the recent findings of Ali et al. (2016), which reported high levels of natural parasitism under Mediterranean climate conditions, but it concurs with their observation that natural populations are only present in the field during the summer, indicating only one generation per year, under the most favourable conditions.

Our experiments and assays indicated that *A. daci* induces mortality, parasitizes, and oviposits on *C. capitata* during all four seasons. Based on previous experiments on the optimal development of this parasitoid, such as suitable host fruits or parasitoid/host ratios (Andleeb et al., 2010; Hosni et al., 2011; de Pedro et al., 2013a,b, 2016, 2017), an experiment was designed to investigate the variation in parasitic activity of *A. daci* over time. We found that *A. daci* parasitic activity (and thus induced mortality) is correlated with temperature and humidity. Parasitism showed significant differences between seasons with greater climatic differences (spring and summer vs. autumn and winter), and increased as the optimal conditions required by the parasitoid were approached. De Pedro et al. (2013a,b) and Harbi et al. (2014) already found significant differences in induced mortality, mainly between summer and the other seasons. We

found that parasitism rates in winter (low temperature) are higher under low levels of humidity, and in summer (high temperature) increase under high humidity (opposite trends occurred for induced mortality). This indicates that during winter, humidity may have no beneficial effect on parasitoid activity, whereas during warmer periods of the year, when water loss risk is higher, *A. daci* benefits from higher humidity to keep its water content at an optimum level, allowing proper functioning of their metabolism. Similar results have been reported from other parasitoids of fruit flies, such as the braconid *Psytalia concolor* (Szépligeti), which displays higher parasitism rates on *Bactrocera oleae* (Rossi) under warm and wet conditions that support growth and development of both parasitoids and hosts (Yokoyama et al., 2006, 2008; Yokoyama & Miller, 2007).

It can be concluded that *A. daci*, despite having a very low fertility under field conditions, exhibits acceptable parasitism rates. Together with its induced mortality, it results in a strong pest population reduction, which is the final aim of the integrated pest management programme against *C. capitata*. Therefore, *A. daci*, as previously suggested by de Pedro et al. (2013a,b) and Ali et al. (2016), is a good candidate to be used in inundative field releases for the management of *C. capitata* in the Mediterranean Basin.

Acknowledgements

This work was partially supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MICINN; projects AGL2010-21349-C02-02 and CGL2010-16730), and by the Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana. Luis de Pedro was funded by an FPU grant (Programa Nacional Español de Becas de Formación de Profesorado Universitario; Grant reference: AP2010-2340). Carlo Polidori was funded by a post-doctoral contract from Universidad de Castilla-La Mancha. We thank Amparo Duato and María José Camaró from IVIA for technical support with insect rearing.

References

- Ali AY, Ahmad AM & Amar JA (2015) Hymenopteran parasitoids (Figitidae and Pteromalidae) of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) on loquat and guava in Tartous, Syria. *Biocontrol Science and Technology* 25: 223–228.
- Ali AY, Ahmad AM, Amar JA, Darwish RY, Izzo AM & Al-Ahmad SA (2016) Field parasitism levels of *Ceratitis capitata* larvae (Diptera: Tephritidae) by *Aganaspis daci* on different host fruit species in the coastal region of Tartous, Syria. *Biocontrol Science and Technology* 26: 1617–1625.

- Andleeb S, Shahid MS & Mehmood R (2010) Biology of parasitoid *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Eucoilidae). Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research 53: 201–204.
- Baranowski R, Glenn H & Sivinski J (1993) Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Florida Entomologist 76: 245–251.
- Beitia F, Falcó JV, Pérez-Hinarejos M, Santiago S & Castañera P (2003) Importación de parasitoides exóticos para el control biológico de *Ceratitis capitata* en la Comunidad Valenciana. Comunitat Valenciana Agraria 24: 10–15.
- Beitia F, Pérez-Hinarejos M, Garzón E, Santiago S, Tarazona I et al. (2007) Lucha biológica contra *Ceratitis capitata*: Himenópteros parasitoides autóctonos. Terralia 63: 34–44.
- Beitia F, Sabater-Muñoz B & Malagón J (2011) Estrategias de manejo integrado de la mosca mediterránea de la fruta en la Comunidad Valenciana. Vida Rural 323: 40–46.
- Bruce AY, Schulthess F & Mueke J (2009) Host acceptance, suitability, and effects of host deprivation on the West African egg parasitoid *Telenomus isis* (Hymenoptera: Scelionidae) reared on East African stemborers under varying temperature and relative humidity regimens. Environmental Entomology 38: 904–919.
- Clausen CP (1978) Tephritidae (Trypetidae, Trupaneidae). Introduced Parasites and Predators of Arthropod Pests and Weeds: A World Review (ed. by CP Clausen), pp. 320–335. Agricultural Handbook No. 480. Washington, DC, USA, ARS-USDA.
- Delrio G & Cocco A (2012) Tephritidae. Integrated Control of Citrus Pests in the Mediterranean Region (ed. by V Vacante & U Gerson), pp. 206–222. Bentham Science, Sharja, UAE.
- El-Heneidy A, Hosny M & Ramadan M (2014) Potential of the parasitoid *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Eucoilidae) for biological control of *Bactrocera zonata* (Diptera: Tephritidae) in Egypt. Ninth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance (ISFFEI), Book of Abstracts, Bangkok, Thailand, p. 220.
- Emana GD (2007) Comparative studies of the influence of relative humidity and temperature on the longevity and fecundity of the parasitoid *Cotesia flavipes*. Journal of Insect Science 7: 19.

- Falcó JV, Pérez-Hinarejos M, Santiago S, Navarro S & Beitia F (2003) Introducción de parasitoides exóticos para el control de insectos plaga: procedimientos de importación y cuarentena. *Contribuciones al Conocimiento de las Especies Exóticas Invasoras*, Vol. 1 (ed. by L Capdevila-Argüelles, B Zilletti & N Pérez Hidalgo), pp. 222-224. GEI Serie Técnica, León, Spain.
- Falcó JV, Garzón-Luque E, Pérez-Hinarejos M, Tarazona I, Malagón J & Beitia F (2006) Two native pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) found in Spain. *IOBC/WPRS Bulletin* 29: 71–74.
- Garzón-Luque E, Beitia F & Falcó JV (2008) Parasitism of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) on the host *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) under mediterranean temperatures. *IOBC/WPRS Bulletin* 38: 125–129.
- Harbi A, de Pedro L, Ferrara FA, Tormos J, Beitia F & Sabater-Muñoz B (2014) Parasitism activity of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae) against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) under Mediterranean Climatic Conditions. *Ninth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance (ISFFEI)*, Book of Abstracts, Bangkok, Thailand, p. 214.
- Hosni M, El-Husseini MM, El-Heneidy A & Atallah FA (2011) Biological aspects of the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saund.) (Diptera: Tephritidae) and its parasitoid species, *Aganaspis daci* Weld (Hymenoptera: Eucoilidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 21: 137–142.
- Jackson JE (2003) *A User's Guide to Principal Components*. Wiley, Hoboken, NJ, USA.
- Kalyebi A, Overholt WA, Schulthess F, Mueke J & Sithanatham S (2006) The effect of temperature and humidity on the bionomics of six African egg parasitoids (Hymenoptera, Trichogrammatidae). *Bulletin of Entomological Research* 96: 305–314.
- Liquido NJ, Shindoa LA & Cunningham RT (1991) *Host Plants of the Mediterranean Fruit Fly, C. capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae): An Annotated World Review. *Miscellaneous Publication 77*, Entomological Society of America, Lanham, MD, USA.

- Martins DS, Skouri W, Chermiti B, Aboussaid H, El Messoussi S et al. (2010) Analysis of two larval-pupal parasitoids (Hymenoptera, Braconidae) in the biological control of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) in Spanish Mediterranean areas. Proceedings of the 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance (ed. by B Sabater-Muñoz, V Navarro-Llopis & A Urbaneja), pp. 252–258. Polytechnic University of Valencia Editorial, Valencia, Spain.
- McGarigal K, Cushman S & Stafford S (2000) Multivariate Statistics for Wildlife and Ecology Research. Springer, New York, NY, USA.
- Moezipour M, Kafil M & Allahyari H (2008) Functional response of *Trichogramma brassicae* at different temperatures and relative humidities. Bulletin of Insectology 62: 245–250.
- Ovruski SM, Aluja M, Sivinski J & Wharton RA (2000) Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. International Pest Management Reviews 5: 81–107.
- Ovruski SM, Wharton RA, Rull J & Guillén L (2007) *Aganaspis alujai* (Hymenoptera: Figitidae: Eucoilinae), a new species attacking *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) in the neotropical region. Florida Entomologist 90: 626–634.
- Papadopoulos NT (2008) Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Encyclopedia of Entomology, Vol. 3 (ed. by JL Capinera), pp. 2318–2322. Springer, Heidelberg, Germany.
- Papadopoulos NT & Katsoyannos BI (2003) Field parasitism of *Ceratitis capitata* larvae by *Aganaspis daci* in Chios, Greece. BioControl 48: 191–195.
- de Pedro L, Harbi A, Ferrara FA, Tormos J, Verdú MJ et al. (2013a) Parasitismo generado por *Aganaspis daci* (Weld) (Hymenoptera: Figitidae), parasitoide de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), en condiciones climáticas mediterráneas. VIII Congreso Anual de Entomología Aplicada, XIV Jornadas Científicas de la SEEA, Book of Abstracts, Mataró, Spain, p. 163.
- de Pedro L, Martínez R, Harbi A, Ferrara FA, Tormos J et al. (2013b) Un nuevo enemigo natural de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) identificado en la Comunidad Valenciana: el parasitoide *Aganaspis daci* (Hymenoptera, Figitidae). Levante Agrícola 416: 153–157.

- de Pedro L, Beitia F, Sabater-Muñoz B, Asís JD & Tormos J (2016) Effect of temperature on the developmental time, survival of immatures and adult longevity of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a natural enemy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Crop Protection* 85: 17–22.
- de Pedro L, Beitia F, Ferrara F, Asís JD, Sabater-Muñoz B & Tormos J (2017) Effect of host density and location on the percentage parasitism, fertility and induced mortality of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Crop Protection* 92: 160–167.
- Pérez-Hinarejos M & Beitia F (2008) Parasitism of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera, Pteromalidae), an idiobiont parasitoid on pupae of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *IOBC/WPRS Bulletin* 38: 130–133.
- Püntener W (1981) *Manual for Field Trials in Plant Protection*, 2nd edn. Agricultural Division, Ciba Geigy, Basle, Switzerland.
- Quicke DLJ (2015) *Biology, Systematics, Evolution and Ecology of Braconid and Ichneumonid Parasitoid Wasps*. Wiley Blackwell, Chichester, UK.
- Sabater-Muñoz B, Falcó JV, de Pedro L, Tormos J, Asís JD et al. (2012) First record, surveillance and biological parameters of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), as parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Spain. *Biological Invasions of Tephritidae: Ecological and Economic Impacts* (ed. by NT Papadopoulos), p.117. *Book of Abstracts, Kolymbari, Crete (Greece)*.
- Stacconi MVR, Grassi A, Dalton T, Miller B, Ouantar M et al. (2013) First field records of *Pachycrepoideus vindemmiae* as a parasitoid of *Drosophila suzukii* in European and Oregon small fruit production areas. *Entomologia* 1: e3.
- Szyniszewska AM & Tatem AJ (2014) Global assessment of seasonal potential distribution of mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE* 9: e111582.
- Tormos J, de Pedro L, Beitia F, Sabater-Muñoz B, Asís JD & Polidori C (2013) Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in *Aganaspis* parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies. *Microscopy and Microanalysis* 19: 1475–1489.

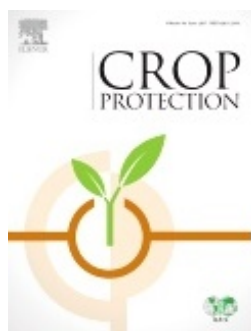
- Verdú MJ, Falcó JV, Beitia F & Sabater-Muñoz B (2011) Identificación de un nuevo agente de control biológico de *Ceratitis capitata* en España, el himenóptero eucoilino *Aganaspis daci*. XXVIII Jornadas de la Asociación Española de Entomología (AeE). Book of Abstracts, Ponferrada, Spain, p. 25.
- Weld LH (1951) A new species of *Trybliographa* (Hymenoptera: Cynipidae). Proceedings of the Hawaiian Entomological Society 14: 331–332.
- Wharton RA, Gilstrap FE, Rhodei RH, Fischel MM & Hart WG (1981) Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera, Tephritidae) in Costa Rica. Entomophaga 26: 285–290.
- Yokoyama VY & Miller GT (2007) Olive fruit fly biology and cultural control practices in California. IOBC/WPRS Bulletin 30: 277–285.
- Yokoyama VY, Miller GT, Stewart-Leslie J, Rice RE & Phillips PA (2006) Olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) populations in relation to region, trap type, season, and availability of fruit. Journal of Economic Entomology 99: 2072–2079.
- Yokoyama VY, Rendón PA & Sivinski J (2008) *Psytalia* cf. *concolor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) in California. Environmental Entomology 37: 764–773.

CAPÍTULO 6

“Effect of host density and location on the percentage parasitism, fertility and induced mortality of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)”

Efecto de la densidad y localización de hospedador sobre el porcentaje de parasitismo, la fertilidad y la mortalidad inducida de *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), parasitoide de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)

Luis de Pedro, Francisco Beitia, Fernando Ferrara, Josep Daniel Asís, Beatriz Sabater-Muñoz, José Tormos



Crop Protection 92 (2017) 160–167

Factor de impacto (2016): 1.834

ISSN: 0261-2194

Resumen: El porcentaje de parasitismo, la fertilidad y la mortalidad inducida (mortalidad de pupas del hospedador, de las que no emergen adultos, atribuida a los parasitoides) del parasitoide *Aganaspis daci* (Weld) infestando larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) fueron estudiados en condiciones de laboratorio e invernadero en función de la temperatura y de la densidad y localización (larvas en dieta artificial o en el interior de frutos) del hospedador. Nuestros estudios mostraron que el rango de temperatura 23–25 °C es el más adecuado cuando se ofrecían larvas en dieta artificial y en el laboratorio, llevando a altas tasas de parasitismo, fertilidad, mortalidad inducida y reducción poblacional (mortalidad total de *C. capitata* causada por el parasitoide, es decir, mortalidad inducida + porcentaje de parasitismo) y a un sex ratio de la descendencia desplazado hacia las hembras ($\frac{\text{♀♀/♀♀} + \text{♂♂}}{\text{♀♀/♀♀} + \text{♂♂}} = 0.55$). Respecto a la densidad de hospedador, el parasitismo y la fertilidad mostraron una respuesta funcional de tipo III con un sex ratio desplazado hacia las hembras (0.54–0.61), mientras que la mortalidad inducida decrecía al incrementarse la densidad de hospedador, y la reducción poblacional mostraba el mismo tipo de respuesta que parasitismo y fertilidad. Cuando las larvas se ofrecían en frutos y en el laboratorio, el parasitismo y la fertilidad, en función de la densidad de hospedador, también mostraban una respuesta funcional de tipo III y un sex-ratio desplazado hacia las hembras (0.51–0.62). Para el caso de las larvas ofrecidas en frutos en el invernadero, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en porcentaje de parasitismo, mortalidad inducida o reducción poblacional respecto a la densidad de hospedador o a la posición del fruto (en suelo o en árbol), aunque el sex ratio sí aparecía desplazado hacia las hembras (posición del fruto: 0.64–0.72; densidad: 0.66–0.76). Respecto a la densidad de hospedador, parasitismo y fertilidad mostraban una respuesta funcional de tipo II. La mortalidad inducida decrecía al

aumentar la densidad, y la reducción poblacional respondía igual que el parasitismo y la fertilidad. Los datos aportados por este estudio acerca de los parámetros demográficos básicos y la respuesta funcional de *A. daci* sobre *C. capitata* bajo diversas condiciones y ambientes contribuirá a evaluar el uso potencial de este parasitoide como agente de control biológico contra esta plaga. Nuestros resultados muestran que *A. daci* presenta una gran habilidad para localizar, capturar, parasitar o, simplemente, matar a *C. capitata* en condiciones de laboratorio y campo.



Effect of host density and location on the percentage parasitism, fertility and induced mortality of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)



Luis de Pedro ^{a, b, *}, Francisco Beitia ^b, Fernando Ferrara ^{b, c}, Josep Daniel Asís ^a, Beatriz Sabater-Muñoz ^{b, d}, José Tormos ^a

^a Universidad de Salamanca, Facultad de Biología, Unidad de Zoología, 37007 Salamanca, Spain

^b Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Unidad Asociada de Entomología, IVIA/CIB-CSIC, Apartado Oficial, 46113 Montcada, Valencia, Spain

^c Instituto Federal Fluminense (IFF), Campus Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro, Brazil

^d Smurfit Institute of Genetics, Trinity College of Dublin, Dublin, Ireland

Abstract: The percentage parasitism, fertility and induced mortality (mortality of host pupae attributed to parasitoids, from which adults do not emerge) of the parasitoid *Aganaspis daci* (Weld) infesting larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) were studied under laboratory and greenhouse conditions for temperature, host location (larvae provided in artificial diet or inside fruit) and host density. For larvae in artificial diet in the laboratory, our findings revealed that 23–25 °C is the most suitable temperature range, leading to high rates of parasitism, fertility, induced mortality, population reduction (total mortality of *C. capitata* caused by the parasitoid, i.e., induced mortality + percentage parasitism), and female-biased sex ratio ($\frac{\text{♀♀}}{\text{♀♀}} + \frac{\text{♂♂}}{\text{♂♂}} = 0.55$). Regarding host density, parasitism and fertility corresponded to a Type III functional response with a female-biased sex ratio (0.54–0.61), while induced mortality decreased with an increase in host density, and population reduction presented the same type of response as parasitism and fertility. Regarding the larvae inside fruits in the laboratory, the analysis showed that parasitism and fertility, depending on host density, also showed a Type III functional response and female-biased sex ratio (0.51–0.62). For larvae provided inside fruits in the greenhouse, our results showed no significant differences regarding fruit position or host density on the percentage parasitism, induced mortality or population reduction, although there was a female-biased sex ratio (fruit position: 0.64–0.72; density: 0.66–0.76). Regarding host density, parasitism and fertility corresponded to a Type II functional response. The induced mortality decreased with increasing density and host population reduction had the same type of response as parasitism and fertility. The information reported here on the key demographic parameters and functional response of *A. daci* infesting *C. capitata* under various environments and situations, will assist to evaluate the potential use of this parasitoid as a biological control agent against this pest. Our results show *A. daci* displays an excellent ability to locate, capture, parasitise, or simply kill *C. capitata*, under laboratory and field conditions.

Keywords: Parasitism (%); Fertility; Induced mortality; Population reduction; Functional response; *A. daci*.

1. Introduction

Aganaspis daci (Weld) (Hymenoptera: Figitidae) is a larval-pupal, solitary, primary endoparasitoid that has been successfully used to control the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) (Baranowski et al., 1993). Therefore, nowadays, it is considered an efficient fruit fly pest control agent. This species was first recorded in 1951 as a larval parasitoid of the oriental fruit fly, *Bactrocera* (formerly *Dacus*) *dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in Malaysia and Taiwan (Weld, 1951). Once its successful control over fruit fly pests in these countries was established, *A. daci* was introduced into several countries to control tephritid species (Clausen, 1978; Wharton et al., 1981). It was first introduced in Hawaii as a potential biological control agent against *B. dorsalis* (Clausen et al., 1965) and, later, it was successfully established in Florida, for biological control of *A. suspensa*, at lower population levels (Baranowski et al., 1993). Other countries where this species has been introduced are México (Jiménez-Jiménez, 1956), Costa Rica (Wharton et al., 1981) and Egypt (El-Heneidy and Ramadan, 2010).

In the Mediterranean Basin, *A. daci* was first recorded parasitising larvae of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) on fig fruits on the Greek Island of Chios in 2003 (Papadopoulos and Katsoyannos, 2003). In Spain, this species was not reported until 2009, when, following trialled release of the imported exotic egg-larval parasitoids *Fopius arisanus* (Sonan), *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) and *D. longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), several *A. daci* specimens were recovered from medfly puparia collected from fig and citrus fruits (Verdú et al., 2011). Previously, only *Spalangia cameroni* Perkins and *Pachycrepoideus vindemmiai* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) had been found as native pupal parasitoids of the medfly (Falcó et al., 2006), with no records of *A. daci* during a 4-year survey from 2000–04. Phylogenetic analysis of cytochrome oxidase I (COI) and internal transcribed spacer (ITS) sequences from *A. daci* Spanish specimens confirmed their assignment to this species, after comparison with individuals from Greece, Israel, Hawaii and Egypt, and to the closely related species *Aganaspis pelleranoi* (Brethes) and *Ganaspis xanthopoda* (Ashmead) (Hymenoptera: Figitidae) (Sabater-Muñoz et al., 2012). Current studies on the biology, ecology and parasitic activity of this parasitoid on *C. capitata* aim to assess its adaptability to mass rearing and its potential as a biological control agent against medfly.

An advanced understanding of the interactions between parasitoids and their hosts can be achieved by studying how parasitoids respond to changes in host density. In this context, the term functional response, originally coined by Solomon (1949), describes the response shown

by individual natural enemies to varying host density. More precisely, the functional response is defined as the relationship between the number of prey or hosts attacked by a predator or parasitoid as a function of prey density. Generally, functional responses are classified into three types, type I to III, according to the graphical shape of definition function (i.e. relationship between number of attacked hosts/prey versus host/prey density). In this respect, the type II functional response is the most common one for invertebrate parasitoids and predators (Fernández-Arhex and Corley, 2004; Vanaclocha et al., 2013); graphically, it is an asymptotic curve that decelerates constantly as prey numbers increase, due to the handling time (i.e., the time it takes the predator to manipulate its prey); the asymptote reflects the maximum attack rate. This type of response leads to inverse density-dependent predation or parasitism (Fernández-Arhex and Corley, 2003). However, a type III functional response could also be characteristic for invertebrate natural enemies (Vanaclocha et al., 2013). This type of response is represented by a sigmoid curve; in this case, as host density rises, the response initially accelerates due to the parasitoid or predator becoming increasingly efficient at finding hosts or prey (attack rate increases or handling time decreases). It then levels off under the influence of handling time or satiation (Fernández-Arhex and Corley, 2003). The type III is the only functional response which may lead to direct density dependence when prey densities are low and thus can potentially stabilize predator-prey interactions (Hassell, 1978).

The study of functional responses under different conditions is essential to describe the parasitic activity of a parasitoid (Oaten and Murdoch, 1975), understand host-parasitoid co-evolutionary relationships (Houck and Strauss, 1985), and evaluate their potential as biological control pest agents (Fernández-Arhex and Corley, 2003). Therefore, in the present study, fertility (as the number of descendants produced by parasitoids), the percentage parasitism (= parasitism rate, as the number of descendants per recovered pupae), induced mortality (as the mortality (i.e., pupae that remain closed) due to parasitoid activity) and population reduction (as the sum of induced mortality plus percentage parasitism) of *A. daci* on *C. capitata* were assessed with regard to the temperature, host location (larvae provided in an artificial diet versus larvae infesting fruits) and host density, under two climatic conditions (laboratory and greenhouse).

2. Material and methods

2.1. Study centre and insects

All experiments in this study were performed in compliance with current Spanish law. *A. daci* specimens were obtained from a laboratory colony housed at the Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA, Valencia, Spain). The colony was established in 2010 with 40

specimens obtained from medfly larvae taken from figs in a nearby Valencian village (Bétera, Spain). Laboratory rearing has since been maintained on the host, *C. capitata* (Martínez-Torres, 2011) (rearing conditions: 24 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ relative humidity (RH) and 16:8 (L:D) photoperiod). The medfly has been reared at the IVIA for over 6 years, using the method of Pérez-Hinarejos and Beitia (2008) (rearing conditions: 27 ± 1 °C, $65 \pm 10\%$ RH and 16:8 (L:D) photoperiod).

2.2. Experimental design

Three experiments were conducted to assess the effect of temperature, host location and host density on parasitism rate, fertility and induced mortality of *A. daci* on *C. capitata*. These experiments differed not only in the conditions under which they were conducted but also in the way host larvae were offered to the parasitoid.

2.2.1. Experiment 1. Larvae provided in artificial diet under laboratory conditions

This experiment was performed in duplicate in a climatic chamber under laboratory conditions ($23\text{--}28$ °C; $65 \pm 10\%$ RH; 16:8 (L:D) photoperiod). *C. capitata* larvae were offered to parasitoids in artificial medfly diet. Twenty-four translucent plastic boxes (20 x 15 x 10 cm) were used as experimental units or parasitism units. Each unit contained water, honey and sugar *ad libitum* as nutritional sources. The parasitism units were provided with side muslin windows for ventilation and an upper muslin window through which 3rd instar larvae of *C. capitata* in artificial diet were offered to parasitoids to assess their parasitic activity. Three 3–5-day-old *A. daci* mating couples were introduced into each parasitism unit. For 24 h over 3 consecutive days, *C. capitata* larvae were supplied to the parasitism units at 15, 60 and 120 larvae per parasitism unit. Therefore, eight parasitism units were used for each host-density treatment. Nine additional parasitism units, containing no parasitoids (three per host density treatment), were used as controls to assess the natural mortality of *C. capitata* larvae. Every day, those larvae that had been exposed the previous day were collected and placed inside a ventilated Petri dish (one per parasitism unit). Petri dishes containing collected larvae/pupae were kept in the abovementioned climatic chamber, beside parasitism units, until the emergence of parasitoid and medfly adults. Emergences and closed puparia were then counted. The effect of temperature on *A. daci* parasitic activity was also assessed in this experiment. Thus, within each replicate, two different temperature ranges, $23\text{--}25$ °C (bottom shelf of the chamber) and $26\text{--}28$ °C (top shelf), were assessed.

For each treatment, we analysed fertility; percentage parasitism; offspring sex ratio; induced mortality; and population reduction.

2.2.2. Experiment 2. Larvae provided in fruit under laboratory conditions

This experiment was conducted in duplicate under laboratory conditions, using the bottom shelf of the abovementioned climatic chamber (23–25 °C, 65 ± 10% RH; 16:8 (L:D) photoperiod). In this instance, larvae were offered to parasitoids inside fruits, reproducing the way they can be found in the field. Fifteen plastic boxes (30 x 25 x 20 cm) were used as parasitism units, each containing water and sugar *ad libitum*. These parasitism units incorporated an upper muslin window for ventilation. Five 3–5-day-old *A. daci* mating couples were placed inside each parasitism unit. Thirty apples (var. Royal Gala) were artificially infested according to Martins et al. (2010), with 30 2nd/3rd instar larvae of the medfly (ten holes per fruit and three larvae per hole). These apples were placed in the parasitism units at 30, 60 and 90 larvae per parasitism unit, establishing three different treatments in relation to host density. Thus, one, two or three apples were placed in five parasitism units in each instance. A layer of vermiculite was previously placed in each parasitism unit to provide the larvae with a suitable substratum to pupate. Apples/larvae were exposed for 4 days. Then, medfly pupae were recovered and put in ventilated Petri dishes (one per parasitism unit), kept in the abovementioned climatic chamber, beside the parasitism units, until the emergence of parasitoid and medfly adults. Emergences and closed puparia were then counted. For each treatment, we analysed: fertility; percentage parasitism; and offspring sex ratio.

2.2.3. Experiment 3. Larvae provided in fruit under greenhouse conditions

This experiment was conducted under semi-field conditions, inside a greenhouse located in the experimental field at the IVIA, between May–July of 2013 with five replicates. Medfly larvae were also provided inside apples. The greenhouse was equipped with four plastic-framed mesh cages (125 x 120 x 70 cm), each containing water and honey as nutritional sources. Fifty 3–5-day-old *A. daci* mating couples were placed inside three of the cages and 10 infested apples were introduced inside each cage. The number of medfly larvae per apple differed among cages, establishing three treatments for host density. In the first cage, each apple contained six larvae (two holes per fruit and three larvae per hole). In the second cage, each apple contained 30 larvae (ten holes per fruit and three larvae per hole), whilst in the third cage, each apple contained 60 larvae (twenty holes per fruit and three larvae per hole). In the fourth cage, without parasitoids, nine apples (three per host density treatment) were individually confined in plastic ventilated cylinders, as control treatments, to assess natural medfly larvae mortality. Furthermore, not only did we consider the effect of host density on *A. daci* parasitic activity, but also the effect of fruit position. Thus, in each cage containing parasitoids, half of the apples were placed on a plastic tray (with a layer of vermiculite for pupation) on the cage floor (soil position), whereas the other five apples were individually fitted inside a polyethylene

mesh (1 cm diameter holes) and hung from an orange tree placed inside the cage (tree position). Apples/larvae were exposed for 4 days and then medfly pupae were recovered. Pupae recovered from the plastic tray were considered from soil treatment, and those recovered from the cage floor (out of the tray) were considered from tree treatment. These recovered pupae were put into ventilated plastic boxes (20 x 15 x 10 cm; one per cage (host density) and position treatment) and kept under laboratory conditions, on the bottom shelf of the abovementioned climatic chamber, until the emergence of medfly/parasitoid adults. Emergences and closed puparia were then counted. For each treatment, we analysed: fertility; percentage parasitism; offspring sex ratio; induced mortality; and population reduction.

2.3. Statistical tools and analysis

Data were analysed using IBM SPSS 17.0 with a significance set at $p = 0.05$. Two-way ANOVA with posthoc Tukey's test was performed to test the percentage parasitism, fertility, induced mortality and population reduction, depending on the factors host density and temperature. Induced mortality (i.e., corrected mortality) was calculated using the Schneider-Orelli formula (Püntener, 1981) as follows:

$$\text{Corrected mortality (\%)} = ((\text{Treatment mortality \%} - \text{Control mortality \%}) / (100 - \text{Control mortality \%})) \times 100$$

Here, population reduction is defined as the sum of induced mortality and percentage parasitism.

Prior to the analysis, data normality was checked and data were transformed, where necessary. Pearson's chi-squared (χ^2) test was used to show any significant differences in the sex ratio ($n = \text{females} / n = \text{males} + \text{females}$), depending on the temperature and host density.

A generalised linear model was used to analyse the functional response, with the aim to discriminate between type II and type III responses. The data were fit to a binomial distribution with Logit link function, then fit to their corresponding functional response equation (Juliano, 2001; Fernández-Arhex and Corley, 2004; Vanaclocha et al., 2013). For the type III response, the attack rate coefficient, which varied with prey density, was obtained from the following equation (Hassell, 1978): $a' = b \times 'x' / (1 + c \times 'x')$, where x is the host density and b and c are constants of itself. Data were adjusted by nonlinear least-squares regression using the iterative estimation method of Levenber–Maarquardt (Monzó, 2010). From the adjustment of these equations, we estimated the parameters of the functional response, attack rate (a') and handling time (T_m).

3. Results

3.1. Experiment 1. Larvae provided in artificial diet under laboratory conditions

Three-way ANOVA [σ^2 (residual variance): 49.98, σ_B^2 (block variance): 0.14] showed that for the variable % parasitism, with respect to factors temperature and host density, the null hypothesis should be discarded (temperature: $F_{1, 282} = 30.10$, $P < 0.001$; host density: $F_{2, 282} = 7.933$, $P < 0.001$) (Table 1). The interaction among these factors was not significant ($F_{2, 282} = 2.249$, $P = 0.107$). A post-hoc Tukey's test only highlighted significant differences ($P < 0.001$) for parasitism percentage at the low-level host densities. Similarly, three-way ANOVA [σ^2 (residual variance): 959.14, σ_B^2 (block variance): 4.2×10^{-5}] showed differences for fertility with regard to the factors temperature ($F_{1, 282} = 12.38$, $P = 0.001$) and host density ($F_{1, 282} = 446.22$, $P \leq 0.001$). The interaction of these factors was not significant ($F_{2, 282} = 5.29$, $P = 0.006$). A post-hoc Tukey's test showed significant differences ($P < 0.001$) for fertility, for all host densities.

The estimated linear and quadratic coefficients were both positive (Table 2), indicating a type III functional response (Juliano, 2001; Vanaclocha et al., 2013). The estimated b and c parameters were 0.110 ± 0.116 and 0.145 ± 0.184 , respectively. The estimated attack rate coefficients were 0.52 days^{-1} for a density of 15 larvae, 0.68 days^{-1} (60 larvae), and 0.72 days^{-1} (120 larvae). The estimated handling time was 0.0029 ± 0.017 days (Table 3). The estimated maximum number of emergences per female was 115 specimens in 24 h (Fig. 1).

Significant differences in the sex ratio were obtained for both temperature ranges ($\chi^2 = 66.88$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$). Additionally, for each range, we observed a biased sex ratio (range 23–25 °C, $\chi^2 = 33.83$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$; range 26–28 °C, $\chi^2 = 175.88$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$), female-biased in both cases. Regarding the sex ratio obtained for host density, the chi-squared test showed significant differences ($\chi^2 = 65.36$, d.f. = 2, $P \leq 0.001$). For each density, we observed a female-biased sex ratio (density 45 larvae (5 larvae per couple/day), $\chi^2 = 28.62$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$; density 180 larvae (20 larvae per couple/day), $\chi^2 = 8.75$, d.f. = 1, $P = 0.003$; density 360 larvae (40 larvae per couple/day), $\chi^2 = 172.38$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$). Regarding induced mortality and population reduction, a three-way ANOVA [induced mortality: σ^2 (residual variance): 39.43, σ_B^2 (block variance): 0.21; population reduction residual variance: 40.41, σ_B^2 (block variance): 0.23] showed differences with respect to the factors temperature (induced mortality: $F_{1, 224} = 39.64$, $P < 0.001$; population reduction: $F_{1, 224} = 40.57$, $P < 0.001$) and host density (induced mortality: $F_{2, 224} = 19.97$, $P < 0.001$; population reduction: $F_{2, 224} = 20.91$, $P < 0.001$). The interaction of these factors was not significant (induced mortality: $F_{2, 224} = 4.05$, $P = 0.401$; population reduction: $F_{2, 224} = 4.15$, $P = 0.431$). A post-hoc Tukey's test only showed significant differences ($P < 0.001$) for lower host densities.

Table 1. Parasitism, fertility, induced mortality, population reduction and sex ratio displayed by *A. daci* – at different temperatures and host densities – on *C. capitata* larvae provided in artificial diet under laboratory conditions (asterisk indicates significant differences, $P \leq 0.05$).

	Temperature		Host density		
	23–25 °C	26–28 °C	15 larvae ^a	60 larvae ^b	120 larvae ^c
% parasitism (Range; Mean \pm SE)	0–100; 67.93 \pm 1.63*	0–100; 54.06 \pm 2.02*	0–100; 54.02 \pm 2.69*	0–94.5; 65.73 \pm 2.08	1.6–91.4; 63.24 \pm 2.08
Fertility (Range; Mean \pm SE)	0–107; 41.88 \pm 2.67*	0–108; 35.72 \pm 2.34*	0–14; 7.64 \pm 0.38*	0–52; 37.21 \pm 1.18*	2–108; 71.55 \pm 2.41*
Induced mortality (Range; Mean \pm SE)	0–90; 17.58 \pm 2.59*	0–23; 3.54 \pm 0.82*	0–90; 10.56 \pm 1.53*	0–52.8; 6.54 \pm 1.04	0–46.6; 3.09 \pm 0.34
Population reduction (Mean \pm SE)	85.51 \pm 3.2*	57.60 \pm 1.01*	64.58 \pm 2.12*	72.27 \pm 1.26	66.33 \pm 1.02
Sex ratio ($\frac{\text{♂♂}}{\text{♀♀}}; \frac{\text{♀♀}}{\text{♀♀} + \text{♂♂}}$)	2679, 3315; 0.55*	1906, 3239; 0.62*	269, 429; 0.61*	1690, 1943; 0.54*	2625, 4144; 0.61*

Induced mortality (= corrected mortality %).

Sex ratio (n = females/n = females + males).

^a5 larvae per couple (female + male) and day x 3 couples (15 larvae per day) x 8 parasitism units x 3 repetitions (days) x 2 temperatures x 2 replicates.

^b20 larvae per couple (female + male) and day x 3 couples (60 larvae per day) x 8 parasitism units x 3 repetitions (days) x 2 temperatures x 2 replicates.

^c40 larvae per couple (female + male) and day x 3 couples (120 larvae per day) x 8 parasitism units x 3 repetitions (days) x 2 temperatures x 2 replicates.

Table 2. Maximum likelihood estimation parameters from the generalised linear model of the proportion of parasitised hosts as a function of initial host densities by fertilised *A. daci* females under laboratory and greenhouse conditions.

	Parameter	Estimate	SE	χ^2	df	P
Laboratory diet	Linear	0.018	0.0024	57.24	1	<0.0001
	Quadratic	0.00001	1.53E-0005	53.14	1	<0.0001
Laboratory fruit	Linear	0.037	0.0195	3.62	1	=0.05
	Quadratic	0.00001	0.002	3.58	1	=0.05
Greenhouse	Linear	-0.006	0.0019	11.514	1	=0.001
	Quadratic	2.34E-006	4.60E-006	25.917	1	<0.0001

Table 3. Functional response type (FR), attack rate (a) (days⁻¹) and estimated prey-handling time (T_h) (days) obtained from non-linear regression of the number of hosts by fertilised *A. daci* females under laboratory and greenhouse conditions.

	FR	a	SE	95% CI	T _h	SE	95% CI	R ²
Laboratory diet	Type III	$b = 0.110$	0.116	-0.118-0.337	0.0029	0.002	-0.002-0.006	0.745
		$c = 0.145$	0.184	-0.217-0.507				
Laboratory fruit	Type III	$b = 0.039$	0.098	-0.162-0.239	0.008	0.020	-0.032-0.049	0.822
		$c = 0.112$	0.374	-0.656-0.880				
Greenhouse	Type II	0.064	0.030	0.002-0.126	0.003	0.027	-0.052-0.057	0.607

R² = are the coefficients of determination from R² of each regression.

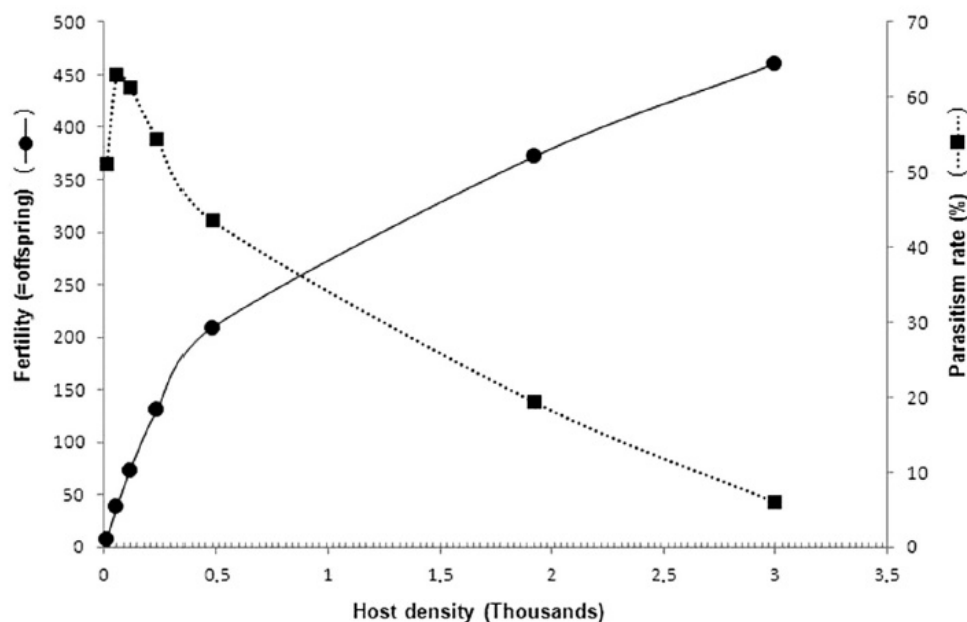


Fig. 1. Functional response curve fit by non-linear least-squares regression of fertilised *A. daci* females infesting larvae exposed in the laboratory in artificial diet¹ (Type III).

¹ 3 mating couples (host density: 5, 20 or 40 larvae per couple and day).

3.2. Experiment 2. Larvae provided in fruit under laboratory conditions

A two-way ANOVA [σ^2 (residual variance): 41.46, σ_B^2 (block variance): 0.20] showed that for the variable % parasitism with respect to the factor host density, the null hypothesis was acceptable ($F_{1, 27} = 0.626$, $P = 0.542$) (Table 4). However, a two-way ANOVA [σ^2 (residual variance): 469.11, σ_B^2 (block variance): 5.1×10^{-5}] showed differences in fertility with respect to the host density factor ($F_{2, 27} = 62.36$, $P \leq 0.001$).

A generalised linear model for the proportion of parasitised hosts showed that the estimated values for the linear and quadratic coefficients were both positive (Table 2), indicating a type III functional response (Juliano, 2001; Vanaclocha et al., 2013). The estimated b and c parameters were 0.0039 ± 0.098 and 0.112 ± 0.374 , respectively. The estimated attack rate coefficients were 0.27 days^{-1} for a density of 30 larvae, 0.30 days^{-1} for a density of 60 larvae, and 0.31 days^{-1} for a density of 90 larvae. The estimated handling time was 0.008 ± 0.020 days (Table 3). The estimated maximum number of emergences per female was 25 specimens in 24 h (Fig. 2).

Similarly, regarding sex ratio obtained according to host density, the chi-squared test showed significant differences ($\chi^2 = 12.12$, d.f. = 2, $P \leq 0.002$). However, a biased sex ratio was only observed for higher densities (density of 60 larvae: $\chi^2 = 27.83$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$; density of 90 larvae: $\chi^2 = 19.15$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$). In both instances, the sex ratio was female-biased.

Table 4. Parasitism, fertility and sex ratio shown by *A. daci* – at different host densities – on *C. capitata* larvae provided inside fruit (apples) under laboratory conditions (asterisk indicates significant differences, $P \leq 0.05$).

	Host density		
	30 larvae ^a	60 larvae ^b	90 larvae ^c
% parasitism (Range; Mean \pm SE)	50–100; 79.16 \pm 4.74	81.1–91.5; 85.49 \pm 1.07	38.9–93.3; 82.04 \pm 4.94
Fertility (Range; Mean \pm SE)	13–30; 22.50 \pm 1.51*	37–54; 47.10 \pm 1.62*	30–84; 68.70 \pm 4.55*
Sex ratio ($\frac{\text{♂♂}}{\text{♀♀}}; \frac{\text{♀♀}}{\text{♀♀} + \text{♂♂}}$)	224,226; 0.51*	217, 398; 0.65*	262, 425; 0.62*

Sex ratio (n = females/n = females + males).

^a6 larvae per couple (female + male) (exposition 4 days) x 2 replicates.

^b12 larvae per couple (female + male) (exposition 4 days) x 2 replicates.

^c18 larvae per couple (female + male) (exposition 4 days) x 2 replicates.

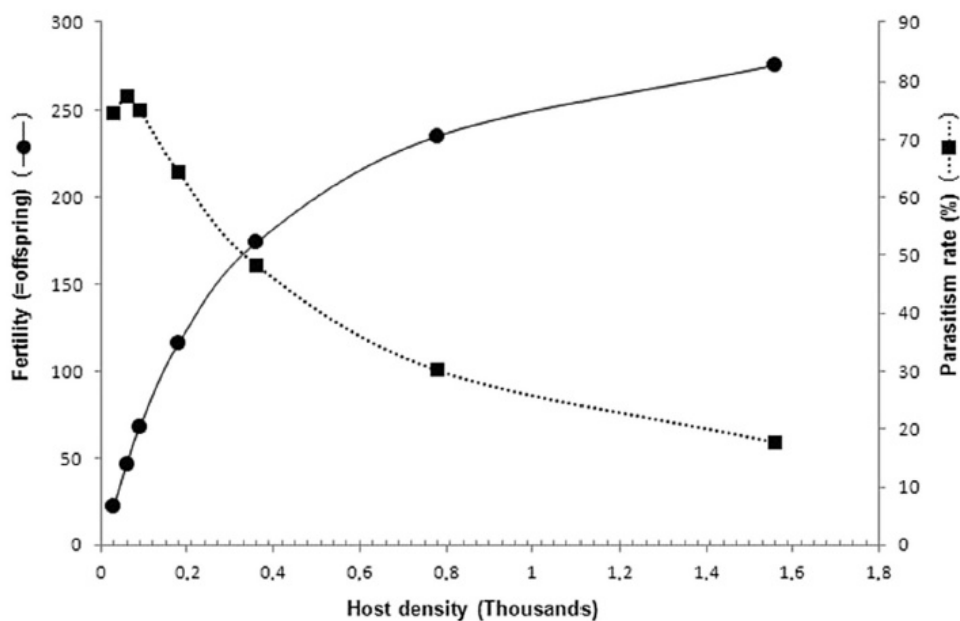


Fig. 2. Functional response curve fit by non-linear least-squares regression of fertilised *A. daci* females infesting larvae exposed in the laboratory inside fruit² (Type III).

² 5 mating couples (host density: 6, 12 or 18 larvae per couple and 4 exposure days).

3.3. Experiment 3. Larvae provided in fruit under greenhouse conditions

Three-way ANOVA [σ^2 (residual variance): 50.12, σ_B^2 (block variance): 4.6×10^{-5}] showed that for the variable % parasitism, with respect to the factors position and host density, the null hypothesis was acceptable (host position: $F_{1, 22} = 1.06$, $P = 0.313$; host density: $F_{3, 22} = 0.235$, $P = 0.871$) (Table 5). The interaction of these factors was not significant ($F_{3, 23} = 0.02$, $P = 0.996$). Likewise, the three-way ANOVA [σ^2 (residual variance): 1106.87, σ_B^2 (block variance): 0.62] did not show differences for fertility with respect to position ($F_{1, 22} = 0.56$, $P = 0.461$), although there were differences with respect to host density ($F_{3, 22} = 18.26$, $P \leq 0.001$). The interaction of these two factors, was not significant ($F_{3, 22} = 0.14$, $P = 0.933$). A post-hoc Tukey's test showed significant differences ($P < 0.002$) for fertility, among the different host densities.

A generalised linear model of the proportion of parasitised hosts showed that the estimated value of the linear coefficient was negative, while the quadratic coefficient was positive (Table 2), indicating a type II functional response (Juliano, 2001; Vanaclocha et al., 2013). The estimated attack rate coefficient was $0.064 \pm 0.030 \text{ days}^{-1}$ and the estimated prey-handling time was $0.003 \pm 0.027 \text{ days}$ (Table 3). The estimated maximum number of emergences per female was 7 specimens in 24 h (Fig. 3).

The chi-squared test showed that there were significant differences in the sex ratio obtained in the two positions ($\chi^2 = 65.36$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$). For each position, we observed a biased sex ratio (tree position: $\chi^2 = 155.34$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$; soil position: $\chi^2 = 41.67$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$). In both instances the sex ratio was female-biased.

Likewise, regarding the sex ratio obtained according to host density, the chi-squared test showed significant differences ($\chi^2 = 15.15$, d.f. = 2, $P = 0.001$). Moreover, for each of the densities, a biased sex ratio was observed (density of 60 larvae: $\chi^2 = 80.04$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$; density of 300 larvae: $\chi^2 = 87.96$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$; density of 600 larvae, $\chi^2 = 28.89$, d.f. = 1, $P \leq 0.001$). In all three instances, the sex ratio was female-biased.

With respect to induced mortality and population reduction a three-way ANOVA [induced mortality: σ^2 (residual variance): 58.67, σ_B^2 (block variance): 0.32; population reduction: σ^2 (residual variance): 59.17, σ_B^2 (block variance): 0.34] did not show significant differences with respect to the factors position (induced mortality: $F_{1, 22} = 0.617$, $P = 0.440$; population reduction: $F_{1, 22} = 0.638$, $P = 0.452$) and host density (induced mortality: $F_{3, 22} = 1.12$, $P = 0.362$; population reduction: $F_{3, 22} = 1.27$, $P = 0.392$). The interaction of these factors was not significant (induced mortality: $F_{3, 22} = 0.12$, $P = 0.946$; population reduction: $F_{3, 22} = 0.11$, $P = 0.926$).

Table 5. Parasitism, fertility, induced mortality, population reduction and sex ratio displayed by *A. daci* – at different host densities – on *C. capitata* larvae inside fruit (apples) in different positions under greenhouse conditions (asterisk indicates significant differences, $P \leq 0.05$).

	Fruit position		Host density		
	Tree	Soil	60 larvae ^a	300 larvae ^b	600 larvae ^c
% parasitism (Range; Mean \pm SE)	6.9–58.9; 28.84 \pm 4.40	3.7–74.8; 38.15 \pm 5.26	28–39.1; 33.56 \pm 5.56	6.9–56; 31.35 \pm 7.52	10.7–63.2; 30.77 \pm 6.9
Fertility (Range; Mean \pm SE)	2–154; 45.93 \pm 12.11	0–108; 35.72 \pm 2.34	0–14; 10.06 \pm 0.38*	5–110; 47.1 \pm 10.23*	30–181; 92.32 \pm 15.86*
Induced mortality (Range; Mean \pm SE)	18.4–92.5; 61.89 \pm 6.5	3.1–96; 53.81 \pm 7.01	58.2–73.3; 65.79 \pm 7.53	36–92.5; 61.9 \pm 8.79	3.1–88.9; 45.1 \pm 8.98
Population reduction (Mean \pm SE)	90.73 \pm 3.26	91.96 \pm 5.28	99.35 \pm 5.18	93.25 \pm 5.96	75.87 \pm 5.29
Sex ratio ($\frac{\text{♂♂}}{\text{♀♀}}; \frac{\text{♀♀}}{\text{♀♀} + \text{♂♂}}$)	332, 888; 0.72*	497, 919; 0.64*	535, 1028; 0.66*	248, 632; 0.72*	46, 147; 0.76*

Induced mortality (= corrected mortality %).

Sex ratio (n = females/n = females + males).

^a30 larvae per 50 couple (female + male) and position (tree/soil) (exposition 4 days) x 5 replicates.

^b150 larvae per 50 couple (female + male) and position (tree/soil) (exposition 4 days) x 5 replicates.

^c300 larvae per 50 couple (female + male) and position (tree/soil) (exposition 4 days) x 5 replicates.

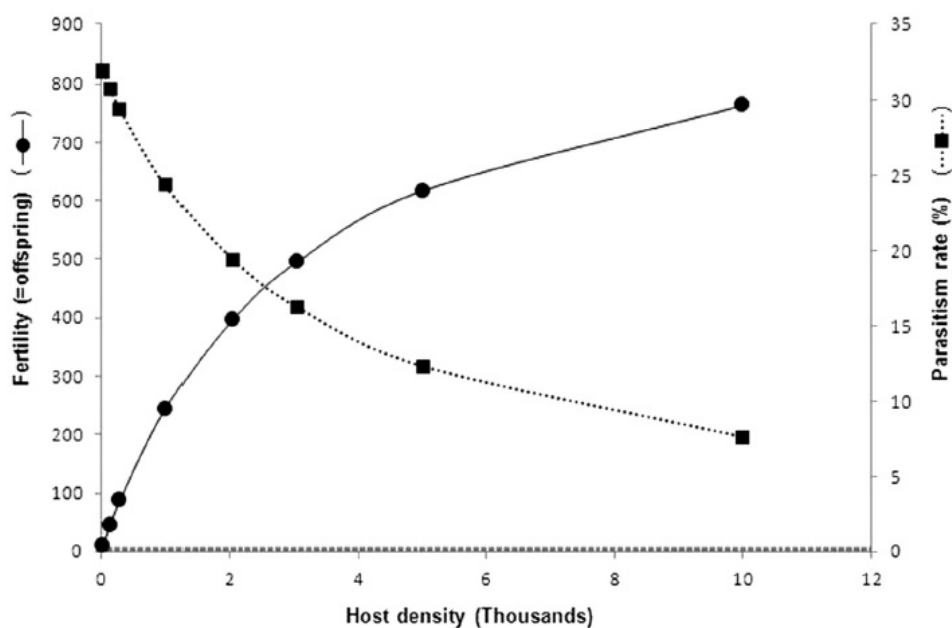


Fig. 3. Functional response curve fit by non-linear least-squares regression of fertilised *A. daci* females infesting larvae provided inside fruit in the greenhouse³ (Type II).

³ 50 mating couples (host density: 60/50, 6 or 12 larvae per couple and 4 exposure days).

4. Discussion

The results of this study indicate that the behaviour and population dynamics of *A. daci*, while infesting *C. capitata*, are not influenced by the particular biology of this tephritid species. In this respect, the results reported herein on the functional response of *A. daci* show that the exposition of this parasitoid under confined laboratory conditions, at high and low host densities, to both larvae provided in the diet and inside the fruit, correspond to a type III functional response. In this instance, we observed how the proportion of parasitised hosts per time unit accelerates with increasing host density. This could be associated with greater efficiency in the search by the parasitoid or a decrease in host-handling time due to learning behaviour (Fernández-Arhex and Corley, 2004), reaching a point where host-handling time limits parasitism rates. Under greenhouse conditions (more similar to natural conditions), with hosts inside fruits (suspended, simulating their position on the tree; or on the floor, simulating fallen fruit) and a host density per female rate more similar to that normally found in the field, the functional response corresponded to type II. This type of response, the most common found in parasitoids (Fernández-Arhex and Corley, 2004), is influenced at lower host densities by the longer time spent searching for hosts, and at higher densities by the greater time spent handling them. The limitation in the eggs that a female parasitoid can deposit can also represent a limiting effect (Hassell, 2000); although in our study *A. daci* females reached fertility rates of 40 offspring per day, meaning 120 descendants in 3 days.

As expected, induced mortality, due to factors including superparasitoidism (see Tormos et al., 2012, 2013), was higher at lower host densities both in the laboratory and the greenhouse. Additionally, the location of the host (exposed in artificial diet or inside the fruit), as well as slight variations in the environmental variables (much more pronounced under greenhouse than laboratory conditions) should result in fertility being significantly lower under greenhouse than the laboratory conditions. However, in both conditions, population reduction was similar and very high, given that lower fertility in the greenhouse was offset by higher induced mortality. This fact, among others, recently led de Pedro et al. (2016) to conclude that *A. daci* is a good candidate for use in biological control and, fundamentally, in inundative releases against *C. capitata*.

The female-biased sex ratio observed in all instances could be due to the temperature at which the trials were carried out. In this respect, previous studies about the effect of this environmental variable (de Pedro et al., 2016) on the developmental time, survival of immature stages and *A. daci* adult longevity, concluded that in the suitable temperature range for development, the proportion of females rises in parallel with increases in temperature.

In summary, this article contributes to increasing our knowledge of the demographic parameters and functional response of *A. daci* attacking *C. capitata* larvae in different environments and situations, adding new results to recent contributions on the effect of environmental variables on the biotic potential of this parasitoid (de Pedro et al., 2016). Collectively, this information leads us to conclude that although *A. daci* cannot be expected to achieve total biological control of *C. capitata* populations, it can certainly be useful in the fight against this pest, primarily through inundative releases made at appropriate times and even using the parasitoid in hotspot control campaigns.

Funding

This work was partially supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MICINN; projects AGL2010-21349-C02-02 and CGL2010-16730), and by the Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana.

Luis de Pedro was funded by an FPU grant (Programa Nacional Español de Becas de Formación de Profesorado Universitario; Grant reference: AP2010-2340).

Acknowledgments

This study was carried out in the laboratories of the Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, at the IVIA research centre (Valencia, Spain). The authors thank Amparo Duato and María José Camaró from IVIA for technical support with insect rearing. The authors thank Ash Watson from the Smurfit Institute of Genetics (Dublin, Ireland) for his help with English grammar and style. The authors also would like to acknowledge to two anonymous reviewers for helpful comments on the manuscript.

References

- Baranowski, R., Glenn, H., Sivinski, J., 1993. Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Fla Entomol. 76, 245–251.
- Clausen, C.P., Clancy, D.W., Chock, Q.C., 1965. Biological control of the Oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. U. S. Dep. Agric. Tech. Bull. 1322, 1–102.
- Clausen, C.P., 1978. Introduced parasites and predators of arthropod pests and weeds: a world reviews. U.S. Dep. Agric. Handb 480, 320–335.
- de Pedro, L., Beitia, F., Sabater-Muñoz, B., Asís, J.D., Tormos, J., 2016. Effect of temperature on the developmental time, survival of immatures and adult longevity of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), a natural enemy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Crop Prot. 85, 17–22.
- El-Heneidy, A.H., Ramadan, M.M., 2010. *Bactrocera zonata* (Saunders) status and its natural enemies in Egypt. In: Sabater-Muñoz, B., Navarro-Llopis, V., Urbaneja, A. (Eds.), 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance Abstracts' book. Polytechnic University of Valencia editorial, Valencia, Spain, p. 115. Available at <https://riunet.upv.es/handle/10251/11200> (last accessed on 17/10/2016).
- Falcó, J.V., Garzón-Luque, E., Pérez-Hinarejos, M., Tarazona, I., Malagón, J., Beitia, F., 2006. Two native pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) found in Spain. IOBC/WPRS Bull. 29, 71–74.
- Fernández-Arhex, V., Corley, J.C., 2003. The functional response of parasitoids and its implications for biological control. Biocontrol Sci. Techn 13, 403–413.

- Fernández-Arhex, V., Corley, J.C., 2004. La respuesta funcional: una revisión y guía experimental. *Ecol. Austral* 14, 83–93.
- Hassell, M.P., 1978. Functional responses. In: Hassell, M.P. (Ed.), *The Dynamics of Arthropod Predator-Prey Systems*. University Press, Princeton, New Jersey, pp. 28–49.
- Hassell, M.P., 2000. *The Spatial and Temporal Dynamics of Host-parasitoid Interactions*. Oxford University Press, Oxford, p. 208.
- Houck, M.A., Strauss, R.E., 1985. The comparative study of functional responses: experimental design and statistical interpretation. *Can. Entomol.* 117, 617–629.
- Jiménez-Jiménez, E., 1956. Las moscas de la fruta y sus enemigos naturales. *Fitófilo* 16, 4–11.
- Juliano, S.A., 2001. Nonlinear curve fitting: predation and functional response curves. In: Scheiner, S.M., Gurevitch, J. (Eds.), *Design and Analysis of Ecological Experiments*. Oxford University Press, New York, pp. 178–196.
- Martínez-Torres, R., 2011. Determinación de la eficacia de *Aganaspis daci* (Weld, 1951) como agente de control biológico de *Ceratitis capitata* (Wiedemann), la mosca mediterránea de la fruta. Master thesis dissertation. Agricultural engineering, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain, p. 150.
- Martins, D.S., Skouri, W., Chermiti, B., Aboussaid, H., El Messoussi, S., Oufdou, K., Carbonell, E., Sabater-Muñoz, B., Beitia, F., 2010. Analysis of two larval-pupal parasitoids (Hymenoptera, Braconidae) in the biological control of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) in Spanish Mediterranean areas. In: Sabater-Muñoz, B., Navarro-Llopis, V., Urbaneja, A. (Eds.), *Proceedings of the 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*. Polytechnic University of Valencia editorial, Valencia, Spain, pp. 252–258. Available at <https://riunet.upv.es/handle/10251/14530> (last accessed on 17/10/2016).
- Monzó, C., 2010. Artrópodos depredadores potenciales de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) presentes en el suelo de cítricos. PhD thesis dissertation. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain, p. 225.
- Oaten, A., Murdoch, W.W., 1975. Functional response and stability in predator-prey systems. *Am. Nat.* 109, 289–298.
- Papadopoulos, N.T., Katsoyannos, B.I., 2003. Field parasitism of *C. capitata* larvae by *Aganaspis daci* in Chios, Greece. *Biocontrol* 48, 191–195.

- Pérez-Hinarejos, M., Beitia, F., 2008. Parasitism of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera, Pteromalidae), an idiobiont parasitoid on pupae of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). IOBC/WPRS Bull. 38, 130–133.
- Püntener, W., 1981. Manual for Field Trials in Plant Protection, 2nd ed. Agricultural Division, Ciba Geigy Limited, Basle, Switzerland, p. 205.
- Sabater-Muñoz, B., Falcó, J.V., de Pedro, L., Tormos, J., Asís, J.D., Papadopoulos, N.T., Verdú, M.J., Beitia, F., 2012. First record, surveillance and biological parameters of *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae), as parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Spain. In: Papadopoulos, N.T. (Ed.), Second TEAM (Tephritid Workers of Europe Africa and the Middle East) Meeting; Biological Invasions of Tephritidae: ecological and economic impacts. Book of Abstracts, Kolymbari, Crete (Greece), p. 117.
- Solomon, M.E., 1949. The natural control of animal populations. J. Anim. Ecol. 18, 1–35.
- Tormos, J., Asís, J.D., Sabater-Muñoz, B., Baños, L., Gayubo, S.F., Beitia, F., 2012. Superparasitism in laboratory rearing of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of medfly (Diptera: Tephritidae). B. Entomol. Res. 102, 51–61.
- Tormos, J., de Pedro, L., Beitia, F., Sabater-Muñoz, B., Asís, J.D., Polidori, C., 2013. Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in *Aganaspis* parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies. Microsc. Microanal. 19, 1475–1489.
- Vanaclocha, P., Papacek, D., Monzó, C., Verdú, M.J., Urbaneja, A., 2013. Intra-guild interactions between the parasitoid *Aphytis lingnanensis* and the predator *Chilocorus circumdatus*: implications for the biological control of armoured scales. Biol. Control 65, 169–175.
- Verdú, M.J., Falcó, J.V., Beitia, F., Sabater-Muñoz, B., 2011. Identificación de un nuevo agente de control biológico de *Ceratitis capitata* en España, el himenóptero eucoilino *Aganaspis daci*. XXVIII Jornadas de la Asociación Española de Entomología (AeE), Book of Abstracts, Ponferrada, Spain, p. 25.
- Weld, L.H., 1951. A new species of *Trybliographa* (Hymenoptera: Cynipidae). Proc. Hawaii. Entomol. Soc. 14, 331–332.
- Wharton, R.A., Gilstrap, F.E., Rhodei, R.H., Fischel, M.M., Hart, W.G., 1981. Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Costa Rica. Entomophaga 26, 285–290.

CONCLUSIONES

1. Los ejemplares recuperados en la Comunidad Valenciana en 2009 y 2010, y determinados como *Aganaspis daci* en base a rasgos morfológicos, realmente pertenecen a esta especie, lo cual se ha constatado a través de análisis moleculares; este parasitoide parece estar naturalizado en esta región, al haberse encontrado en años posteriores (2011 y 2012). No obstante, no se ha podido determinar una ruta de procedencia del mismo, al no observarse diferenciación genética con el resto de poblaciones testadas.
2. El ciclo de vida de *Aganaspis daci*, bajo condiciones ambientales de 25 °C de temperatura, humedad relativa de $65 \pm 10\%$, y fotoperíodo de 16:8 (L:O), dura una media de 32-33 días. En esta especie se presentan cuatro estados larvarios, de los cuales los dos primeros son endoparasitarios, el cuarto ectoparasitoide, y el tercero presenta una naturaleza intermedia entre endo y ectoparasitoide (idiobionte y cenobionte). Morfológicamente, las fases preimaginales de *A. daci* se asemejan a las de *Aganaspis pelleranoi*, incluyendo en ambos casos un huevo pedunculado, larvas de primer y segundo estado eucoiliformes, larvas de tercer estado y madura himenopteriformes y una pupa adéctica y exarada. En *A. daci* son muy características las diferenciaciones tegumentarias larvarias, muchas de ellas probablemente con función sensorial, que se presentan fundamentalmente en el mesosoma y metasoma. El equipamiento sensilar del adulto de *A. daci* y *A. pelleranoi* es muy similar, incluyendo siete tipos de sensilas antenales (placoideas, celocónicas tipos I y II, campaniformes y tricoideas tipos I, II y III). El ovipositor de ambas especies, por su parte, consta de dos valvas, una doble (valva I) y una sencilla (valva II), albergando la primera sensilas similares a las celocónicas antenales.
3. La temperatura tiene un efecto muy relevante sobre la supervivencia, el desarrollo y la reproducción de *Aganaspis daci*. La longevidad de esta especie decrece con la temperatura dentro del intervalo 15-35 °C, siendo el rango 20-25 °C el más adecuado para el desarrollo y la supervivencia de inmaduros del parasitoide, ya que las temperaturas inferiores prolongan mucho el tiempo de desarrollo y las superiores llevan a una mortalidad muy alta de inmaduros. La razón sexual de su descendencia se va desplazando hacia hembras a medida que aumenta la temperatura en el rango efectivo. La t_0 (umbral mínimo de desarrollo) y la K (integral térmica) para el desarrollo total de esta especie son 8.5°C y 500 DD, respectivamente.
4. *Aganaspis daci* muestra una clásica haplodiploidía arrenotoca como modo de reproducción sobre *Ceratitis capitata*. El “mating” o emparejamiento reduce significativamente la longevidad de las hembras del parasitoide, si bien parece tener un

efecto positivo sobre ciertos parámetros biológicos relacionados con su actividad parasitaria, tales como la fertilidad o la mortalidad inducida sobre *C. capitata*. La edad de las hembras, por su parte, afecta negativamente a la tasa de parasitismo generada por *A. daci*.

5. *Aganaspis daci* puede ejercer superparasitismo sobre *Ceratitis capitata*, fenómeno cuya presencia e intensidad están afectadas significativamente por la densidad de hospedadores disponibles (con una relación inversa, es decir, a mayor densidad de hospedador, menor ocurrencia e intensidad de superparasitismo) y por la densidad local de hembras conespecíficas (que, en este caso, estimula este fenómeno).
6. Las condiciones ambientales mediterráneas determinan que la fertilidad de *Aganaspis daci* sobre *Ceratitis capitata* sea muy baja comparada con la mostrada por otros parasitoides de este díptero, llevando a una alta mortalidad de inmaduros del parasitoide. No obstante, *A. daci* sí parasita durante todo el año y es capaz de reducir eficientemente las poblaciones de *C. capitata* independientemente de las condiciones ambientales, gracias sobre todo a los elevados niveles de mortalidad que induce en la mosca. Los principales factores ambientales que afectan a la actividad parasitaria de *A. daci* son la temperatura media y la humedad media.
7. La respuesta funcional mostrada por *Aganaspis daci* sobre *Ceratitis capitata* varía en función de las condiciones ambientales, independientemente de otros factores como el medio en el que se presente el hospedador. Esta respuesta es de tipo III bajo condiciones de laboratorio, mientras que, en condiciones de invernadero, más similares a las que se dan en el medio natural mediterráneo, la respuesta es de tipo II, la más común en parasitoides y que se corresponde con un parasitismo inversamente denso-dependiente.

En definitiva, se puede concluir que, si bien no es probable que *Aganaspis daci* alcance un control biológico total sobre las poblaciones naturales de *Ceratitis capitata* (principalmente por su alta sensibilidad a los factores ambientales), sí se le puede considerar como un buen candidato para ser empleado en programas de lucha biológica contra este tefrítido en la Cuenca Mediterránea -principalmente mediante sueltas inundativas en el momento adecuado o para el control de focos aislados de la plaga- por su alto potencial para reducir sus poblaciones. Para ello es fundamental tener en cuenta, durante su cría y liberación en campo, diversos factores que tienen un efecto determinante sobre su biología y su actividad parasitaria, tales como las condiciones ambientales antes citadas, la edad de los ejemplares utilizados, la razón sexual existente en la población del parasitoide o la densidad de hospedadores sobre la que se desea actuar.

