



El Colegio de la Frontera Sur

**Competencia interespecífica asociada al control biológico
por aumento de moscas del género *Anastrepha*
(Diptera: Tephritidae)**

Tesis

Presentada como requisito parcial para optar al grado de
Doctor en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable
Con orientación en Agroecología y Manejo de Plagas

Por

Félix David Murillo Cuevas

2016

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre María de los Ángeles Cuevas Cortez † que me dio mucho amor y me llenó de sabios consejos que hicieron de mí un hombre capaz de enfrentar todos los retos y adversidades de la vida.

A mi padre José Félix Murillo González, que me ha heredado su carácter, inteligencia, honradez y rectitud, que me ha permitido ser un buen hombre y enfrentar satisfactoriamente los retos más difíciles en mi vida.

A mi esposa Mayra Sánchez Gómez y a mis hijos José David y Valeria, por todo el sacrificio, confianza y apoyo en esta difícil etapa de mi vida.

A mis hermanas Flor Cristina y Bertha Argelia, por el gran apoyo y cariño que me dan en los momentos más valiosos y difíciles de mi vida.

A todas las personas que contribuyeron en la realización de este proyecto a quienes les guardo mi gratitud y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Gran Poder Divino, por todas las bendiciones que recibí y por permitirme salir adelante con este gran reto de vida.

Al Dr. José Pablo Liedo Fernández investigador del Colegio de la Frontera Sur, por su excelente dirección, sincera amistad y apoyo en mi formación académica y personal.

Al Dr. Pablo Jesús Montoya Gerardo investigador del Programa Moscafrut SENASICA-SAGARPA, por su excelente dirección, sincera amistad y apoyo en mejorar mi formación académica y personal.

Al Dr. Héctor Cabrera Mireles investigador del Colegio de la Frontera Sur, por su invaluable apoyo, excelente asesoramiento y amistad de toda una vida. Reconozco que sin su apoyo, no hubiera podido llevar a buen término esta aventura y por ello le estoy profundamente agradecido.

Al Dr. Juan Francisco Barrera Gaytán investigador del Colegio de la Frontera Sur, por su apoyo, amistad y excelente asesoramiento.

A la MC. María Guadalupe Nieto López investigadora del Colegio de la Frontera Sur, por su valioso apoyo en el trabajo con Microscopía Electrónica de Barrido.

A la Dra. Dora Alicia Ortega Zaleta, por sus valiosos consejos y amistad de toda una vida.

A la Dirección General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA (Director Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga) por el material biológico proporcionado para este trabajo.

Al Programa Mosca de la Fruta de la Dirección General de Sanidad Vegetal (SENASICA-SAGARPA), por las facilidades otorgadas durante la estancia de investigación que realicé en Metapa de Domínguez, Chiapas.

Al Dr. Jorge Cancino Díaz y MC. Olga Patricia López Hernández (Lab. Control Biológico, Programa Moscafrut SENASICA-SAGARPA), por su asistencia técnica durante la estancia de investigación que realicé en Metapa de Domínguez, Chiapas.

Al MC. Javier Valle-Mora (ECOSUR) por la asistencia en los análisis estadísticos.

A los Sinodales Dra. Ariane Liliane Jeanne Dor, Dr. Jorge Toledo Arreola y Dr. Jaime Gómez Ruiz, por sus aportes y contribuciones durante la revisión del documento de tesis.

Al Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Tapachula, por la oportunidad brindada para continuar mis estudios de doctorado y muy especialmente a Beatriz Romero Valadez y Paulina Gonzáles (posgrado), por todo el apoyo en mis trámites académicos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que me permitió continuar mis estudios de doctorado.

Al Proyecto No. 163431 del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT, por el apoyo financiero para realizar los trabajos de la tesis.

A Ana Lilia, Gerardo de Jesús, Guillermo Jaime, Jazmín y Gilberto, por su amistad y apoyo brindado.

A mis compañeros y amigos con quienes compartí la aventura del postgrado, Miguel Vázquez, Laura Jiménez, Yensi Recinos, Reynolds III Mandujano, Enoc Gómez, Wilmar, Ricardo, Salome Méndez, Sarahi, Edwin, Zitlalic, Jovani, Ernesto, Alma, Mayra y Alicia.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
CAPITULO I	
Competencia intrínseca entre <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> y tres especies de parasitoides nativos (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) de moscas de la fruta <i>Anastrepha</i> (Diptera: Tephritidae).....	8
CAPITULO II	
First instar larvae morphology of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of <i>Anastrepha</i> (Diptera: Tephritidae) fruit flies. Implications for interspecific competition.....	30
CAPITULO III	
<i>Doryctobracon areolatus</i> (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of <i>Anastrepha obliqua</i> (Diptera, Tephritidae).....	46
CAPITULO IV	
Competencia intrínseca entre parasitoides residentes e invasores que atacan a la mosca de la fruta de las Indias Occidentales <i>Anastrepha obliqua</i> (Diptera: Tephritidae).....	65
CAPITULO V	
Liberaciones por aumento de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Hymenoptera: Braconidae): efecto sobre las poblaciones de <i>Anastrepha</i> spp. (Diptera: Tephritidae) y su parasitismo natural.....	82
CONCLUSIONES FINALES.....	105
LITERATURA CITADA.....	108
ANEXOS.....	114

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar si el control biológico por aumento genera competencia interespecífica con parasitoides nativos residentes en las áreas de liberación y su impacto. Se plantearon dos objetivos particulares: 1) determinar el efecto de atributos intrínsecos en las interacciones entre cuatro especies de parasitoides nativos y *Diachasmimorpha longicaudata*, y 2) determinar el efecto de las liberaciones aumentativas de *D. longicaudata* sobre el parasitismo natural. Para el primer objetivo se presentan cuatro capítulos: I) competencia intrínseca entre *D. longicaudata* y tres especies de parasitoides nativos en laboratorio; II) comparación de la morfología de larvas de primer instar de cuatro especies de parasitoides nativos y *D. longicaudata*; III) determinación de la capacidad de *Doryctobracon areolatus* para parasitar huevos y larvas recién eclosionadas de *Anastrepha obliqua*; y IV) competencia intrínseca entre *D. longicaudata* como invasor y dos especies nativas como residentes en frutos infestados expuestos en jaulas de campo. Los resultados demostraron que la morfología de la larva de *Utetes anastrephae* compensa la competencia con *D. longicaudata*, y que la especie *Doryctobracon areolatus* tiene la capacidad de parasitar embriones en el interior de huevos y larvas recién eclosionadas de *A. obliqua*, lo cual puede representar una ventaja al competir con *D. longicaudata*. Se confirmó que las especies nativas cuando son residentes defienden su recurso satisfactoriamente contra *D. longicaudata*. Para el segundo objetivo particular se determinó del efecto de las liberaciones por aumento de *D. longicaudata* sobre *Anastrepha* spp. y sobre el parasitismo natural (capítulo V), cuyo resultado permitió comprobar que las liberaciones por aumento de *D. longicaudata* complementan el parasitismo natural y reducen de manera significativa la infestación de frutos por *A. obliqua*.

Palabras clave: *D. longicaudata*, *D. areolatus*, *A. obliqua*, competencia intrínseca, competencia extrínseca

INTRODUCCIÓN

Las moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) representan una de las plagas más importantes de la fruticultura en el mundo. Causan un impacto económico directo al infestar la fruta y otro indirecto debido a las restricciones de cuarentena impuestas por muchos países para restringir su entrada (Aluja, 1994; Follett y Neven, 2006; Aluja y Mangan, 2008). Las moscas de la fruta de la familia Tephritidae del género *Anastrepha* (Schiner) son consideradas plagas importantes de los frutales que se cultivan desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Aluja, 1994; Aluja y Mangan, 2008). De las casi 200 especies descritas hasta la fecha, las de mayor importancia económica son: *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), *A. grandis* Loew, *A. ludens* (Loew), *A. obliqua* (Macquart), *A. serpentina* Wiedemann, *A. striata* Schiner y *A. suspensa* (Loew) (Aluja, 1994; Malavasi y Zucchi, 2000). En México se conocen 32 especies de este género, de las cuales *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina* y *A. striata* son las de importancia agrícola (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993). Todas estas especies son oligófagas (se alimentan de varios géneros y especies de plantas de una misma familia) o polífagas (se alimentan de especies de plantas pertenecientes a diversas familias) (Aluja, et al., 2000).

Las especies de parasitoides son uno de los factores bióticos de mortalidad que contribuyen en la regulación de la población de tefrítidos (Ovruski, et al., 2000). Los parasitoides son insectos que en estado larvario son parásitos de otros artrópodos, el huésped (hospedero o anfitrión), mientras que en estado adulto son de vida libre (Bernal, 2007). El uso de enemigos naturales (parasitoides, depredadores y patógenos) para el control biológico de plagas agrícolas ha sido de gran interés en los últimos años, debido principalmente al efecto adverso que generan los plaguicidas en el ambiente (Lewis, et al., 1997; De Bach y Rosen, 1991; Knipling, 1992; Godfray, 1994; Jervis y Kidd, 1996; Quicke, 1997; Hochberg y Ives, 2000).

En concordancia con las tendencias globales de reducir el uso de insecticidas y agroquímicos en general, en el caso de moscas de la fruta se ha fomentado el uso del Control Biológico por Aumento (CBA) mediante la liberación de parasitoides (Sivinski, et al. 1996; Montoya, et al., 2000a). El CBA se ha definido como la estrategia donde un

número muy grande de enemigos naturales son criados y liberados en periodos críticos para la supresión de poblaciones plagas a corto plazo (Greathead y Waage, 1983).

El control biológico de moscas de la fruta se ha basado históricamente en las liberaciones de especies de parasitoides exóticos como *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), *D. tryoni* (Cameron), *Aceratoneuromyia indica* (Silvestri), *Psytalia incisi* (Silvestri), *P. concolor* (Szépligeti), *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani) y *Fopius arisanus* (Sonan) (Wharton, 1989; Purcell, 1998; Montoya, et al., 2000a; Ovruski, et al., 2000; Montoya y Cancino, 2004). Sin embargo, pocas de estas especies lograron establecerse o regular la población de su hospedero (Aluja, et al., 1990; López, et al., 1999; Sivinski, et al., 2000; Ovruski, et al., 2000; Eitam, et al., 2004). Una especie que se estableció fue *D. longicaudata*, la cual es utilizada para el control biológico de moscas de la fruta (López, et al., 1999; Montoya, et al., 2000a; 2005; 2007). En Hawai se liberaron contra la mosca oriental (*Bactrocera dorsalis*) y del mediterráneo (*Ceratitis capitata*) especies como *F. arisanus*, *F. vandenboschi* (Fullaway), *D. tryoni*, *D. longicaudata*, *Psytalia fletcheri* (Silvestri), *Procecidochares incisi* (Silvestri) y *Tetrastichus giffardianus* (Silvestri), de las cuales lograron establecerse *D. longicaudata*, *D. tryoni*, y *F. arisanus* (Bess, et al., 1961; Haramoto y Bess, 1970; Wong y Ramadán, 1987).

En contraste, los parasitoides nativos han recibido poca atención, excepto para los estudios sistemáticos y poblacionales de especies que atacan moscas de géneros de importancia económica como *Anastrepha* (Aluja, et al., 1990; 2003; López, et al., 1999; Ovruski, et al., 2000; 2004). Sin embargo, el interés de aumentar estratégicamente la mortalidad causada por especies nativas a través de las liberaciones aumentativas de parasitoides (e.g., Sivinski, et al., 1996; 1997; 2000; Purcell, 1998; Montoya, et al., 2000a), ha dado un nuevo impulso a los estudios de liberación de parasitoides en relación a las especies nativas (Serra, et al., 2011) y de competencia/coexistencia entre parasitoides nativos y exóticos (Sivinski, et al., 1998; Sivinski, et al., 2001; García-Mendel, et al., 2007; Paranhos, et al., 2013; Miranda, et al., 2015). Estos estudios han tenido la finalidad de investigar los posibles efectos de las interacciones competitivas entre especies de parasitoides y como éstas pueden afectar o beneficiar al control biológico de moscas de la fruta, ya que existen enormes variaciones en la simetría de

interacciones competitivas que van desde una amplia gama de casos donde ambos competidores son afectados de manera similar hasta enormes asimetrías donde solo un competidor es afectado (Sivinski, et al., 1997; Sivinski, et al., 1998; Sivinski, et al., 2000; Wang, et al., 2003; García-Mendel, et al., 2007; Aluja, et al., 2013; Paranhos, et al., 2013; Miranda, et al., 2015).

Las Interacciones competitivas de más de un recurso compartido pueden involucrar individuos de la misma especie, así llamada competencia intraespecífica, o puede implicar interacciones entre individuos de diferente especie, es decir competencia interespecífica (Price, et al., 2011). La competencia interespecífica puede llevar a dos condiciones ecológicas, a un traslape de nicho que da lugar a una exclusión competitiva o una divergencia de nicho, que promueve la coexistencia (Mills, 1999). El control biológico ha generado algunos ejemplos de exclusión competitiva entre especies de parasitoides (Bess, et al., 1961; Sivinski, et al., 1996; Sivinski, et al., 1998; Wang, et al., 2003; Eitam, et al., 2004), mientras que las comunidades naturales de parasitoides proporcionan evidencia de la coexistencia a través de mecanismos tales como la partición de nicho (Sivinski, et al. 1997; Sivinski, et al., 2000; García-Mendel, et al., 2007) y competencia compensada a través de diferentes mecanismos (Sivinski, et al., 2001; Kroder y Messing, 2010; Aluja, et al., 2013).

En México existe un amplio gremio de parasitoides nativos que atacan al género *Anastrepha*. Destacando por su abundancia *Doryctobracon areolatus* (Szepliget), *Doryctobracon crawfordi* (Viereck), *Utetes anastrephae* (Viereck) y *Opius hirtus* (Fischer) (Hymenoptera: Braconidae) (López, et al., 1999). Estos se han encontrado parasitando de manera natural larvas de moscas en frutales silvestres, de traspatio o sin manejo agronómico en diversas regiones del país (López, et al., 1999; Aluja, et al., 2003; Sivinski, et al., 2000). Sin embargo, el parasitismo natural ejercido por estos parasitoides no es suficiente para suprimir o mantener las poblaciones de moscas de la fruta a niveles que no causen daño significativo (Aluja, et al., 1990; 2003; López, et al., 1999; Sivinski, et al., 2000). Para lograr un efectivo manejo de esta plaga, los niveles de parasitismo natural tendrían que incrementarse mediante la liberación masiva de parasitoides. Un aspecto importante es que las características agroecológicas

particulares de cada región pueden influir de manera distinta en las interacciones entre los parasitoides liberados por el CBA y las nativas.

Los programas de control biológico por aumento para moscas de la fruta en México, han utilizado principalmente al parasitoide exótico *D. longicaudata* (Montoya y Cancino, 2004; Montoya, et al., 2000a; 2007), se conoce que esta especie es muy competitiva y ejerce altos niveles de parasitismo (emergencia del parasitoide en relación a la emergencia del hospedero) y superparasitismo (varios huevos de una especie de parasitoide en un mismo hospedero), tanto en laboratorio como en campo (Aluja, et al., 1990; Sivinski, et al., 1997; 2000; Montoya, et al., 2000a; 2000b; 2011; 2013; González et al., 2007; 2010). Este comportamiento puede tener un efecto negativo sobre las especies nativas, debido a una posible competencia extrínseca, que se da cuando las hembras de parasitoides introducidas confrontan a las nativas por el acceso a hospederos o localización de estos (Griffiths y Godfray, 1988), o intrínseca, que ocurre debido al parasitismo de hospederos ya parasitados (multiparasitismo), donde larvas de especies introducidas pueden competir con otras larvas o destruir huevos previos a la eclosión, debido a cambios fisiológicos inducidos en el hospedero (Fisher, 1961) o a través del ataque físico utilizando las mandíbulas o apéndices caudales típicos de ciertas larvas de primer instar (Salt, 1961).

Es poco lo que se sabe de las interacciones que se dan entre los parasitoides utilizados en el control biológico por aumento y los parasitoides nativos que ejercen un control natural de moscas de la fruta, así como de la competencia interespecífica entre las especies de parasitoides involucradas.

En este trabajo se consideró como especie exótica a *D. longicaudata* por ser la que se utiliza actualmente en el CBA de moscas de la fruta en México y como especies nativas a *D. crawfordi*, *D. areolatus*, *U. anastrephae* y *O. hirtus* por ser las más abundantes, compartir con *D. longicaudata* el estatus de parasitoide larva-prepupa y presentan diferentes grados de traslape espacio temporal con la especie exótica (Sivinski, et al., 1996; 1997; 2000; López, et al., 1999; García-Medel, et al., 2007).

El manejo de los parasitoides a través de liberaciones por aumento, puede ser capaz de concentrar el parasitismo donde y cuando se requiera hacer un mayor control (Wong, et al., 1991). Sin embargo, para su adecuado manejo es necesario contestar las

siguientes preguntas: 1) ¿Determinan las características biológicas o de comportamiento específicas el resultado de las interacciones entre parasitoides liberados y residentes? y 2) ¿Cómo afectan las liberaciones de *D. longicaudata* al parasitismo natural? En relación a estas preguntas, este trabajo plantea las siguientes hipótesis: 1) los atributos intrínsecos (biología, morfología de larva, discriminación, superparasitismo y multiparasitismo) son los que determinan la predominancia de una(s) especie(s); y 2) si el parasitismo natural es bajo, el control biológico por aumento no ocasionará competencia y los parasitoides liberados aprovecharán los huéspedes no aprovechados por los parasitoides residentes.

El orden de presentación de los capítulos en el presente documento está en relación a las hipótesis. Para probar la hipótesis de que los atributos intrínsecos son los que determinan la predominancia de una(s) especie(s), se presentan cuatro capítulos. El primero trata sobre la competencia intrínseca entre *D. longicaudata* y tres especies de parasitoides nativos en condiciones de laboratorio, el cual responde a la pregunta ¿qué tipo de interacción se da entre parasitoides nativos y *D. longicaudata* cuando compiten bajo condiciones controladas? En este trabajo no se incluyó a la especie nativa *D. areolatus*, ya que no se contó con una cría de laboratorio de esta especie para el suministro de material biológico necesario para el experimento. Las observaciones realizadas en el experimento del capítulo uno llevaron a la siguiente pregunta ¿cuáles son las características morfológicas que pueden afectar la competencia interespecífica? De tal manera, el segundo capítulo presenta una comparación de la morfología de larvas de primer instar de cuatro especies de parasitoides nativos y *D. longicaudata*. El tercer capítulo se realizó con la finalidad de documentar aspectos biológicos y ecológicos de la especie nativa *D. areolatus*, los cuales fueron observados en campo y considerados relevantes en la competencia interespecífica. De tal manera que el tercer capítulo trata sobre la capacidad de *D. areolatus* de parasitar etapas tempranas de desarrollo de *A. obliqua*, y contribuye a responder a la pregunta ¿la acción temprana de *D. areolatus* es una ventaja en la competencia con *D. longicaudata*? El cuarto capítulo busca también contribuir a responder la pregunta generada en el tercer capítulo e investigar sobre los posibles mecanismos que intervienen en la coexistencia o traslape de nicho de las especies *D. longicaudata*, *D. areolatus* y *U. anastrephae*, los cuales

pueden competir por el mismo hospedero en frutos de ciruelas tropicales del género *Spondias*. Por lo tanto, el cuarto capítulo es sobre la competencia intrínseca entre *D. longicaudata* como invasor y *D. areolatus* y *U. anastrephae* como residentes, realizado con frutos hospederos en jaulas en campo. Por último, para probar la hipótesis sobre la generación de competencia por las liberaciones de parasitoides se realizó un trabajo de campo durante dos años que consistió en determinar el efecto de las liberaciones por aumento de *D. longicaudata* sobre las poblaciones de *Anastrepha* spp. y sobre el parasitismo natural, lo cual constituye el quinto capítulo.

CAPITULO I

Competencia intrínseca entre *Diachasmimorpha longicaudata* y tres especies de parasitoides nativos (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) de moscas de la fruta *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae)

Félix D. Murillo^a, Pablo Montoya^b, Héctor Cabrera-Mireles^a Juan F. Barrera^a y Pablo Liedo^a

^a El Colegio de la Frontera Sur. Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5. Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico.

^b Programa Moscafrut, SAGARPA-SENASICA. Camino a los Cacaotales S/N, Metapa de Domínguez, CP 30860, Chiapas, México.

Corresponding author: Félix D. Murillo (El Colegio de la Frontera Sur. Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5. Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico. Phone +52 (962) 628 9800, ext.5604. fmurillo@ecosur.edu.mx).

Resumen

Se estudió la competencia intrínseca entre *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) y las especies nativas *Doryctobracon crawfordi* (Viereck), *Utetes anastrephae* (Viereck) y *Opius hirtus* (Fischer) (todos Braconidae: Opiinae) a nivel de laboratorio, así como los efectos que esta competencia puede tener sobre las estrategias de parasitismo y la proporción sexual de la progenie. *D. longicaudata* resulto ser la especie más competitiva, pues en todas las condiciones logró los porcentajes de parasitismo más altos. Sin embargo, cada uno de los parámetros de *D. longicaudata* fue afectado negativamente por la exposición previa de las larvas a los parasitoides nativos y en el ataque simultáneo de todas las especies. *U. anastrephae* fue la única especie que mantuvo su nivel de parasitación cuando todas las especies atacaron simultáneamente a los hospederos disponibles. La probabilidad de emergencia de una hembra de *D. longicaudata* fue asociada positivamente con el incremento en el número de cicatrices presentes sobre la cutícula de la pupa, pero no para las especies de parasitoides nativos. Se concluyó que *D. longicaudata* es un competidor intrínseco superior a *D. crawfordi*, *U. anastrephae* y *O. hirtus* ya sea que actué como residente o invasor. También fue la única especie que mantuvo una proporción sexual favorable a hembras en todas las condiciones bajo evaluación. *U. anastrephae* fue la especie nativa que resultó menos afectada por la presencia competitiva de *D. longicaudata*, lo cual sugiere que podría ser un agente de control biológico complementario contra moscas de la fruta del género *Anastrepha*.

Palabras claves: superparasitismo, multiparasitismo, *U. anastrephae*, *D. crawfordi*, *O. hirtus*, competencia, proporción sexual, larvas de parasitoides, ventajas adaptativas

1. Introducción

El control biológico por aumento (CBA) se ha practicado en México a través de las liberaciones del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) para el control biológico de moscas de la fruta del género *Anastrepha* y de algunos brotes de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (López et al. 1999; Montoya et al. 2005; Montoya et al. 2007). Lo anterior, permitió el establecimiento exitoso de esta especie en algunos lugares del país, donde coexiste con especies nativas como *Doryctobracon crawfordi* (Viereck), *Utetes anastrephae* (Viereck) y *Opius hirtus* (Fischer) (todos Braconidae: Opiinae) (Aluja et al. 1990; López et al. 1999; Sivinski et al. 2000).

Aunque una de las características del CBA es la seguridad que ofrece en materia de protección al ambiente (De Bach 1974, Hokkanen y Pimentel 1989), en la comunidad internacional existe la preocupación del impacto que el control biológico pueda tener sobre la biodiversidad natural (Thomas y Willis 1998). En este sentido, es posible que las interacciones competitivas interespecíficas que se presenten puedan afectar más a las especies nativas que a las exóticas, ya que es probable que el poco tiempo de interacción entre las especies no produzca oportunidades de selección que generen divergencia de nicho o produzcan respuestas facultativas a la competencia de la especie exótica (Sivinski et al. 1997; Pedersen y Mills 2004). Un ejemplo de lo anterior lo puede constituir la especie nativa *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Braconidae: Opiinae), cuyo rango de dispersión en el estado de Florida USA fue reducido aparentemente por la presencia de *D. longicaudata* (Sivinski et al. 1998).

Las interacciones competitivas pueden darse a nivel extrínseco, cuando las hembras de parasitoides introducidas confrontan a las nativas por el acceso a hospederos o localización de estos (Griffiths y Godfray, 1988), o intrínseco, donde larvas de especies introducidas pueden competir con otras larvas o destruir huevos previos a la eclosión, debido a cambios fisiológicos inducidos en el hospedero (Fisher, 1961) o a través del ataque físico utilizando las mandíbulas o apéndices caudales típicos de ciertas larvas de primer instar (Salt, 1961).

Diachasmimorpha longicaudata es un endoparasitoide koinobionte (se desarrolla en estados de desarrollo del hospedero que crecen activamente, aún después de ser parasitados) solitario de larva-pupa de mosca de la fruta que se utiliza comúnmente en

diversas partes del mundo como un agente de control biológico (Sivinski et al. 1996; Montoya et al. 2000a). Es originario de la región Indo-Filipina donde ataca a larvas de *Bactrocera* spp. (Diptera: Tephritidae) (Wharton y Marsh 1978), ha sido introducido en gran parte de la región Neotropical (Ovruski et al. 2000), donde coexiste con parasitoides nativos que atacan *Anastrepha* spp. en hospederos frutales nativos y exóticos (López et al. 1999; Ovruski et al. 2000). En México *D. longicaudata* se ha reportado parasitando a varias especies del género *Anastrepha* (Aluja et al. 1990; López et al. 1999). Es un competidor intrínseco capaz de eliminar a *Fopius arisanus* (Sonan) y *F. persulcatus* (Silvestri) cuando la competencia física toma lugar entre larvas de primer instar (Palacio et al. 1991, Wang et al. 2008), también ataca físicamente a larvas de su congénere *D. tryoni* (Cameron) (Ramadan et al. 1994) y suprime el desarrollo del parasitoide nativo *D. areolatus* (Paranhos et al. 2013).

Doryctobracon crawfordi es un endoparasitoide koinobionte solitario de larva-pupa que parasita larvas de *A. ludens* en frutos grandes como cítricos y mango (López et al. 1999; Ovruski et al. 2000). En México su cría en laboratorio se realiza con larvas de tercer instar de *A. ludens* (Aluja et al. 2009). Esta especie tiene uno de los ovipositores más grandes en comparación con otros parasitoides nativos de *Anastrepha* (Sivinski et al. 2001) y aparentemente no tiene una segregación de nicho con *D. longicaudata* cuando ambos parasitan larvas de *Anastrepha ludens* (Loew) en los cítricos (Sivinski et al. 1997). En pruebas de multiparasitismo y superparasitismo en laboratorio, *D. crawfordi* resultó ser un competidor inferior a *D. longicaudata* (Miranda et al. 2015) y su superparasitismo no es una estrategia adaptativa cuando ataca larvas de *A. ludens* (Ayala et al. 2014), en comparación a *D. longicaudata* (González et al. 2007; Montoya et al. 2011; 2013). El forrajeo de *D. crawfordi* se ve afectado por la presencia de heteroespecíficos cuando compite en ambientes de baja densidad del hospedero en pruebas de jaulas de campo (García-Medel et al. 2007).

Utetes anastrephae es un endoparasitoide koinobionte solitario de larva-pupa de moscas *Anastrepha* que se encuentra desde la Florida hasta Argentina (Ovruski et al. 2000). El ovipositor es corto en comparación con otros opiines mexicanos, y forrajea relativamente en pocas especies de frutos, por lo general pequeños (Sivinski et al. 1997; 2000). En México se ha reportado parasitando solamente a *Anastrepha obliqua*

(Macquart) en frutos del género *Spondias* y comparte su nicho con el nativo *D. areolatus* y el exótico *D. longicaudata* (López et al. 1999; Ovruski et al. 2000). Su cría en laboratorio se ha establecido utilizando larvas de tercer instar de *A. ludens* (Aluja et al. 2009). En competencia intrínseca es típicamente victorioso sobre *D. areolatus* (Aluja et al. 2013) pero su competencia con *D. longicaudata* es más similar (Paranhos et al. 2013).

Opius hirtus es un parasitoide koinobionte solitario de larva-pupa con un reducido rango de hospederos. Tiene un ovipositor relativamente corto en comparación a otros parasitoides de *Anastrepha*, entre sus hospederos hay dos especies raras, *Anastrepha cordata* (Aldrich) y *Anastrepha alveata* (Stone), que se encuentran a nivel local y en pequeñas cantidades en Veracruz (López et al. 1999; Sivinski et al. 2000; Aluja et al. 2003). Su cría en laboratorio ha sido solamente en larvas de *A. ludens* (Aluja et al. 2009). En pruebas de jaulas de campo, esta especie presentó un buen rendimiento de forrajeo en competencia con *D. longicaudata*, *D. crawfordi* y *U. anastrephae*, en ambientes de alta densidad de hospederos y frutos en suelo y dosel (García-Medel et al. 2007).

El presente estudio tuvo como objetivos evaluar la competencia intrínseca entre *D. longicaudata* y las especies nativas *D. crawfordi*, *U. anastrephae* y *O. hirtus*, a nivel de laboratorio, así como determinar los efectos que esta competencia puede tener sobre las estrategias de parasitismo y la proporción sexual de la progenie.

2. Materiales y métodos

2.1. Área de trabajo y material biológico

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Control Biológico del Programa MOSCAFRUT SENASICA-SAGARPA, en Metapa de Domínguez, Chiapas, México, bajo condiciones de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60-80% HR y fotoperíodo 12:12 (L:D). Se utilizaron larvas de *A. ludens* y *A. obliqua* de 8 días de edad y hembras grávidas de los parasitoides *D. longicaudata*, *U. anastrephae*, *D. crawfordi* y *O. hirtus* (5-9 días de edad) con experiencia previa de oviposición, proporcionados por la planta MOSCAFRUT y la cría

de parasitoides nativos del laboratorio de Control Biológico del Programa MOSCAFRUT.

2.2. Competencia intrínseca

Se evaluó la competencia intrínseca entre *D. longicaudata* y cada una de las especies de parasitoides nativos utilizando jaulas plexiglass (30×30 cm) como arena experimental. En estas jaulas se colocaron 30 ♀ parasitoides por especie en exposición independiente, secuencial y simultánea junto con la unidad de parasitación (cajas de Petri de 9 cm de diámetro recortadas de la orilla) rellenas de dieta fresca sobre la que se colocaron 300 larvas de tercer instar del hospedero, cubiertas con tela organza. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) exposición independiente de las larvas a cada una de las especies de parasitoides durante 3h, 2) exposición secuencial de las larvas primero al parasitoide exótico (3h) y dos horas después, por separado, a cada una de las especies nativas, 3) exposición secuencial de larvas, por separado, primero a cada especie de parasitoides nativos (3h) y después de dos horas al parasitoide exótico, 4) larvas expuestas de manera simultánea al exótico y cada uno de los parasitoides nativos de manera independiente, y 5) larvas expuestas de manera simultánea a 15 ♀ de cada especie de parasitoides bajo evaluación.

Con base en un sentido ecológico se decidió utilizar larvas de *A. obliqua* para la evaluación con *U. anastrephae*, mientras que para *D. crawfordi* y *O. hirtus* se utilizaron larvas de *A. ludens*. Para la exposición a todas las especies juntas se utilizaron larvas de *A. ludens*.

Al finalizar la exposición, las unidades de parasitación fueron removidas y su contenido (larvas más dieta), vertido en contenedores de plástico de ocho centímetros de diámetro por cuatro centímetros de altura cubiertos con una tapa perforada forrada con tela de organza. Las larvas se mantuvieron en dieta artificial por un día más para que completaran su desarrollo. Posteriormente se separaron de la dieta con agua del grifo y se regresaron a su contenedor con vermiculita húmeda para facilitar la pupación.

Tres días después de la exposición, se tomó al azar una muestra del 10% (30 pupas) de cada tratamiento, las cuales se disecaron utilizando un microscopio estereoscopio (Carl Zeiss, Discovery.V8), con la finalidad de buscar evidencia de

parasitismo, multiparasitismo, superparasitismo y competencia intrínseca. Las larvas de cada especie se identificaron de acuerdo a las siguientes características morfológicas: *D. longicaudata* presenta un cuerpo pequeño, caudado, vermiforme y fuertemente segmentado, con capsula cefálica y mandíbulas grandes en relación a *D. crawfordi* y *O. hirtus* (Figura 1); *D. crawfordi* es pequeño y ligeramente robusto, segmentado y translucido, con capsula cefálica y mandíbulas pequeñas en relación a *D. longicaudata* (Figura 1a); *O. hirtus* es grande, robusto y ligeramente segmentado, con capsula cefálica y mandíbulas más pequeñas en relación a *D. longicaudata* (Figura 1b); *U. anastrephae* es robusto y grande, con capsula cefálica y mandíbulas tan grandes como *D. longicaudata* (Figura 2), de acuerdo con Murillo et al. 2016.

El resto de las pupas de la muestra se mantuvieron en vermiculita húmeda en los contenedores hasta la emergencia de los parasitoides y las moscas. Para todos los tratamientos se efectuaron 12 repeticiones.

2.3. Relación entre el superparasitismo y la proporción sexual

Se utilizaron pupas obtenidas de larvas expuestas tres días antes a 30 ♀ parasitoides por especie, utilizando jaulas plexiglass (30×30 cm) y como unidades de oviposición cajas de Petri de 9 cm de diámetro recortadas de la orilla (sin borde), rellenas de dieta recién elaborada donde se colocaron 300 larvas de tercer instar de *A. obliqua* para la especie *U. anastrephae* y *A. ludens* para el resto de las especies de parasitoides.

Se seleccionaron 100 pupas con cicatrices de oviposición como indicador de superparasitismo (de acuerdo a Montoya et al. 2003, 2011) por cada especie de parasitoide, y se determinó por conteo directo el número de cicatrices por pupa, utilizando un microscopio estereoscopio (Carl Zeiss, Discovery.V8). Cada pupa se colocó en una celda individual (1 cm de diámetro y profundidad, con 1 g de vermiculita húmeda) de una cámara de plástico de 100 celdas, con cubierta transparente (6×6 cm), hasta que emergieron los parasitoides adultos. Para efecto de análisis solo se utilizaron datos de cicatrices de pupas donde emergieron parasitoides. Se utilizaron 3 repeticiones por especie.

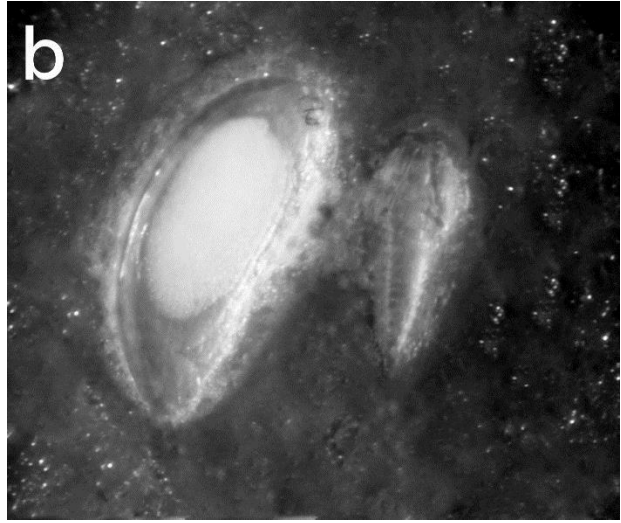
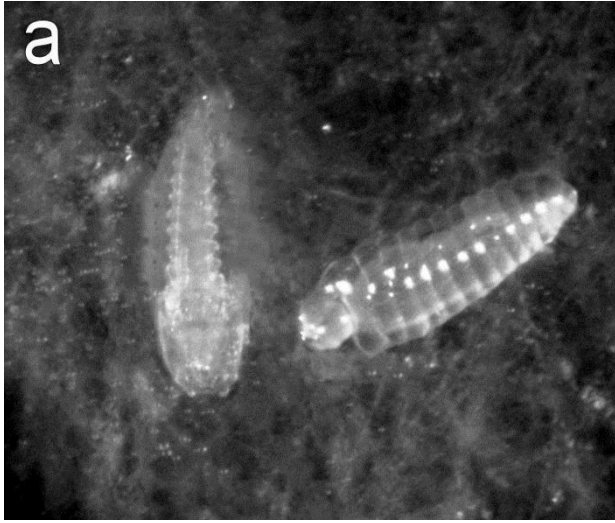


Figura 1. Larvas con diferentes tamaños de capsulas cefálicas. a) *D. longicaudata* y *D. crawfordi*; b) *D. longicaudata* y *O. hirtus*. Fotografiadas con una cámara Sony Cyber-shot Carl Zeiss®, utilizando un microscopio estereoscopio (Carl Zeiss, Discovery.V8).

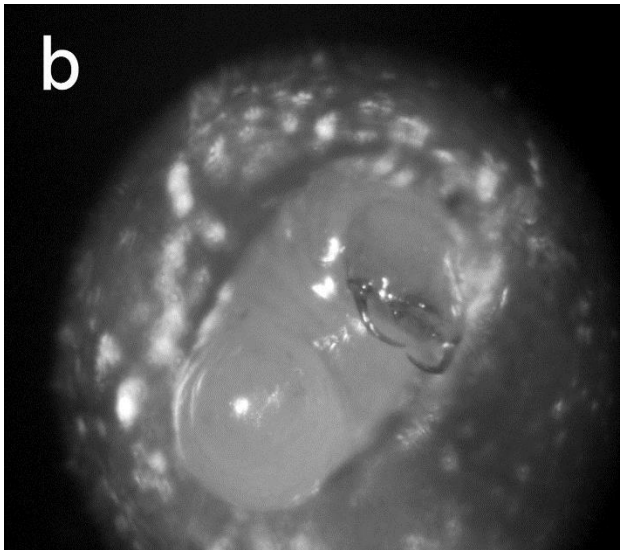
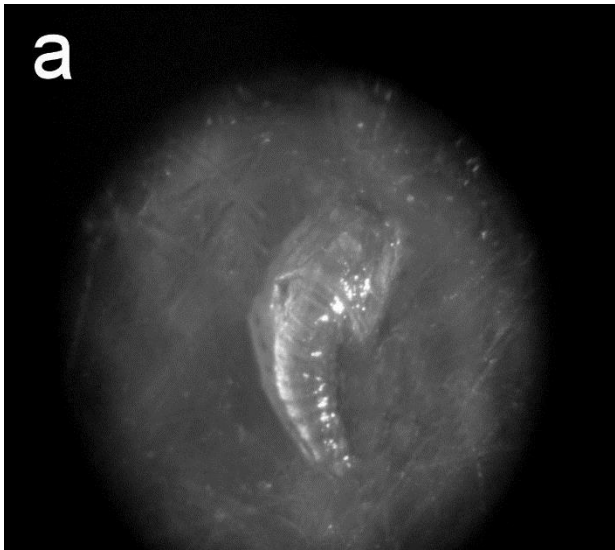


Figura 2. Larvas con similar tamaño de capsulas cefálicas. a) *D. longicaudata*; b) *U. anastrephae*. Fotografiadas con una cámara Sony Cyber-shot Carl Zeiss®, utilizando un microscopio estereoscopio (Carl Zeiss, Discovery.V8).

2.4. Análisis de datos

Competencia intrínseca. Las variables de respuesta consistieron en a) porcentaje de pupas parasitadas, b) porcentaje de pupas superparasitadas, c) porcentaje de pupas multiparasitadas, d) porcentaje de parasitismo, estimado con la fórmula: (número de parasitoides que emergieron / número de parasitoides y moscas que emergieron) x 100 y e) proporción sexual. Los datos de porcentajes fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada. Se compararon las exposiciones por especie de parasitoide utilizando un análisis de varianza y las medias fueron comparadas por el procedimiento de Tukey ($\alpha= 0.05$), utilizando el programa estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, 2008).

Relación entre el superparasitismo y la proporción sexual. Para el análisis estadístico se utilizó una regresión logística binomial con el sexo como variable dependiente y el número de cicatrices como predictor (véase Wilson y Hardy, 2002). Los análisis se realizaron con el programa estadístico JMP versión 5.0.1. 1989-2003.

3. Resultados

3.1. Competencia intrínseca

Todas las especies de parasitoides multiparasitaron las larvas que habían sido previamente expuestas a heteroespecíficos, con resultados variables entre las especies y tratamientos. *D. longicaudata* resultó ser la especie más competitiva, pues en todas las condiciones (i.e., cuando fue el residente, invasor, o ante el ataque simultáneo de todas las especies), logró los porcentajes de mayor parasitismo. Sin embargo, es importante destacar que cada uno de los parámetros de *D. longicaudata* fue afectado negativamente por la exposición previa de las larvas a los parasitoides nativos y en el ataque simultáneo de todas las especies.

El porcentaje de pupas parasitadas por especies nativas fue afectado de manera significativa (*D. crawfordi* $P= 0.0007$, *U. anastrephae* $P= 0.0127$, *O. hirtus* $P= 0.0039$) por la exposición previa de las larvas a *D. longicaudata*. *Utetes anastrephae* fue la única especie que mantuvo su cuota de parasitación cuando todas las especies atacaron simultáneamente a los hospederos disponibles; todas las demás disminuyeron su porcentaje de pupas parasitadas (Cuadro 1).

Todas las especies presentaron superparasitismo (Figura 3) aunque las especies nativas superparasitaron sus hospederos en porcentajes notoriamente menores que *D. longicaudata*. Las únicas especies cuyas larvas de primer instar fueron observadas en un comportamiento de competencia intraespecífica directa a través de agresión física fueron *U. anastrephae* y en menor medida *D. longicaudata* (Figura 4), lo cual fue documentado mediante la disección de pupas. En exposición previa de las larvas a *D. longicaudata*, las especies que resultaron con menor superparasitismo fueron *D. crawfordi* ($F_{4,55} = 5.77$, $P = 0.0006$) y *U. anastrephae* ($F_{4,55} = 3.43$, $P = 0.0142$); resultados similares para *D. crawfordi* se obtuvieron en exposición simultánea de todas y para *U. anastrephae* en exposición simultánea con *D. longicaudata* (Cuadro 1).

Todas las especies presentaron multiparasitismo; *D. longicaudata* y *U. anastrephae* fueron las únicas especies cuyas larvas de primer instar presentaron una competencia interespecífica directa a través de una agresión física, lo cual pudo observarse en las disecciones de pupas (Figura 5). Los valores más bajos de porcentaje de pupas multiparasitadas se registraron para las especies *D. crawfordi* ($F_{3,44} = 31.28$, $P = 0.0001$) y *O. hirtus* ($F_{3,44} = 11.76$, $P = 0.0001$) en exposiciones previas y secuenciales con *D. longicaudata* respectivamente; ninguno de los tipos de exposición afectó el porcentaje de pupas multiparasitadas por *U. anastrephae* (Tabla 1).

El parasitismo de las especies nativas se redujo de manera significativa por *D. longicaudata*; en todas las exposiciones para *D. crawfordi* ($F_{4,55} = 136.2$, $P = 0.0001$) y en exposición previa y simultánea para *U. anastrephae* ($F_{4,55} = 30.6$, $P = 0.0001$) y *O. hirtus* ($F_{4,55} = 42.08$, $P = 0.0001$), respectivamente. En el tratamiento cinco, la exposición de los hospederos a todas las especies de parasitoides juntas afectó el nivel de parasitismo de todas las especies, excepto a *U. anastrephae* (Cuadro 2). *D. longicaudata* fue la única especie que en todas las circunstancias mantuvo una proporción sexual favorable a hembras aunque el número de machos aumentó significativamente en las exposiciones previas de los hospederos a las especies nativas (*D. crawfordi* $F_{4,55} = 4.25$, $P = 0.0045$, *U. anastrephae* $F_{4,55} = 11.46$, $P = 0.0001$, *O. hirtus* $F_{4,55} = 5.50$, $P = 0.0008$) (Cuadro 2).

3.2. Relación entre el superparasitismo y la proporción sexual

La probabilidad de emergencia de una hembra de *D. longicaudata* fue asociada positivamente con el incremento en el número de cicatrices presentes sobre la cutícula de la pupa ($\chi^2= 32.57$, $P= 0.0001$), lo cual no ocurrió en parasitoides nativos, cuyas probabilidades de emergencia de una hembra fue negativamente asociada con el incremento en el número de cicatrices presentes sobre la cutícula de la pupa (*U. anastrephae* $\chi^2= 7.67$, $P= 0.0056$, *D. crawfordi* $\chi^2= 3.57$, $P= 0.0588$, *O. hirtus* $\chi^2= 4.12$, $P= 0.0427$) (Figura 6).

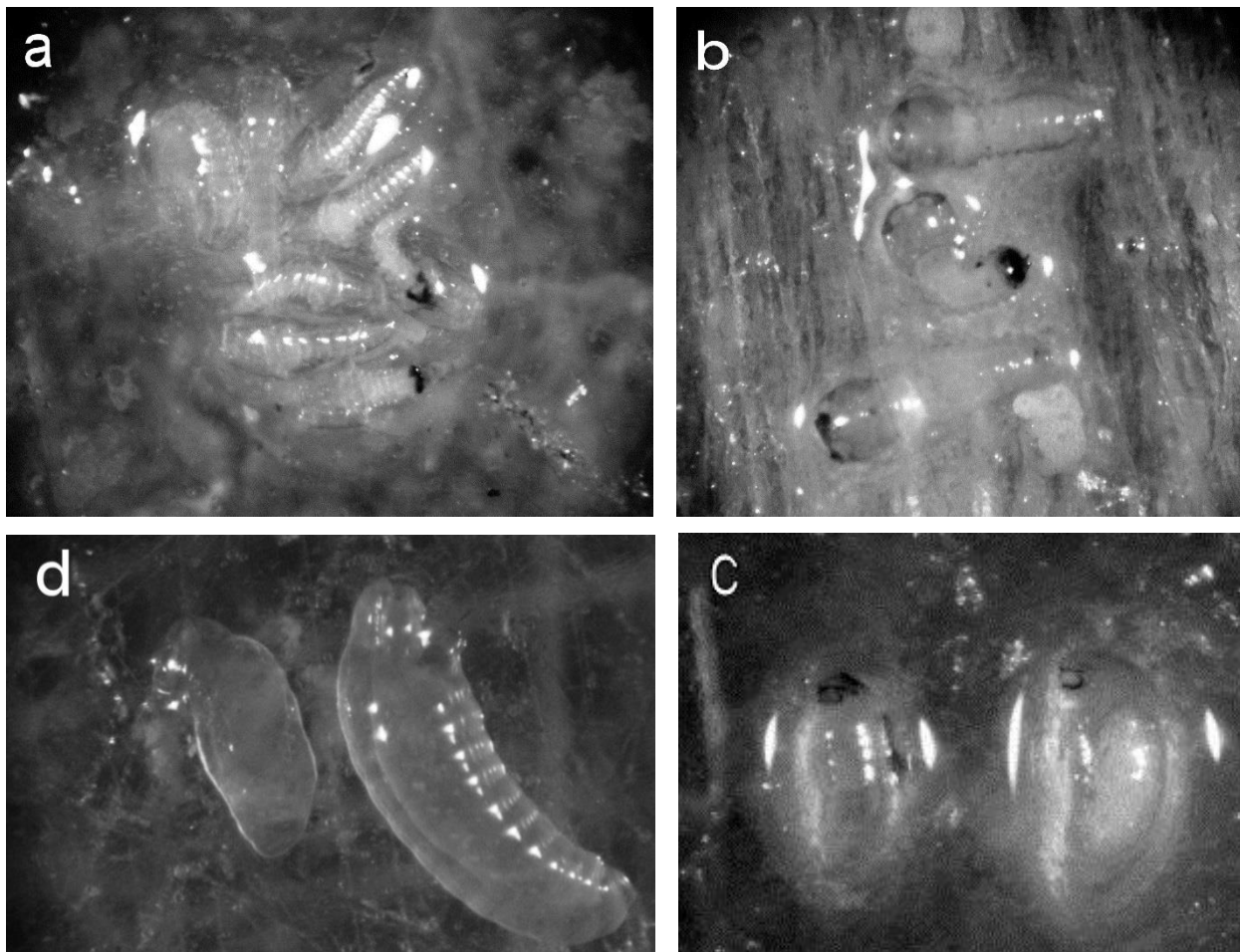


Figura 3. Superparasitismo. a) Ocho larvas de *D. longicaudata*, b) tres larvas de *U. anastrephae*, c) dos larvas de *D. crawfordi* y c) dos larvas de *O. hirtus*. Cada grupo de larvas fue encontrado en el interior de una pupa de *Anastrepha*. Fotografiadas con una cámara Sony Cyber-shot Carl Zeiss®, utilizando un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, Discovery.V8).

Cuadro 1. Porcentaje (\pm EE) de pupas parasitadas, superparasitadas y multiparasitadas por *D. longicaudata*, *D. crawfordi*, *U. anastrephae* y *O. hirtus* en cada uno de los tratamientos (N=30 pupas / tratamientos), las cuales fueron disecadas con un microscopio estereoscopio.

Tratamientos	Parasitadas	Superparasitadas	Multiparasitadas	Parasitadas	Superparasitadas	Multiparasitadas			
	<i>D. longicaudata</i>			vs			<i>D. crawfordi</i>		
	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0007	<i>P</i> = 0.0015			
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	90.8 \pm 1.9 a	52.2 \pm 6.1 a	-----	-----	-----	-----			
<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>D. crawfordi</i>	90.3 \pm 2.3 a	48.6 \pm 4.5 a	15.3 \pm 1.5 c	18.1 \pm 1.9 b	1.2 \pm 0.5 b	15.3 \pm 1.5 c			
<i>D. longicaudata</i> + <i>D. crawfordi</i>	87.5 \pm 2.9 a	55.8 \pm 4.4 a	51.9 \pm 2.5 a	60.3 \pm 2.1 a	4.7 \pm 0.9 a	51.9 \pm 2.5 a			
<i>D. crawfordi</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	63.9 \pm 3.5 b	14.7 \pm 3.0 b	36.1 \pm 3.6 b	55.0 \pm 3.4 a	3.3 \pm 1.0 ab	36.1 \pm 3.6 b			
Todas las especies juntas*	68.9 \pm 4.0 b	28.9 \pm 2.9 b	41.1 \pm 4.2 ab	28.3 \pm 4.8 b	1.1 \pm 0.6 b	26.1 \pm 4.4 bc			
<i>D. crawfordi</i> (Testigo)	-----	-----	-----	66.4 \pm 3.4 a	4.9 \pm 1.0 a	-----			
	<i>D. longicaudata</i>			vs			<i>U. anastrephae</i>		
	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0008	<i>P</i> = 0.0032	<i>P</i> = 0.0127	<i>P</i> = 0.0973			
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	90.0 \pm 1.6 a	60.5 \pm 3.7 a	-----	-----	-----	-----			
<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>U. anastrephae</i>	85.3 \pm 1.6 a	50.0 \pm 2.9 a	20.0 \pm 2.5 c	25.8 \pm 2.6 b	1.9 \pm 0.6 b	20.0 \pm 2.5 a			
<i>D. longicaudata</i> + <i>U. anastrephae</i>	87.5 \pm 1.4 a	58.6 \pm 2.7 a	29.7 \pm 3.6 b	35.0 \pm 3.6 ab	1.9 \pm 0.7 b	29.7 \pm 3.6 a			
<i>U. anastrephae</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	63.3 \pm 3.8 b	16.9 \pm 2.1 c	21.9 \pm 3.2 c	43.6 \pm 2.6 a	4.7 \pm 1.0 ab	21.9 \pm 3.2 a			
Todas las especies juntas*	68.3 \pm 4.1 b	28.8 \pm 2.9 b	41.1 \pm 4.2 a	41.1 \pm 3.4 a	7.8 \pm 2.1 a	32.2 \pm 4.2 a			
<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	-----	-----	-----	41.1 \pm 4.5 a	4.7 \pm 1.4 ab	-----			
	<i>D. longicaudata</i>			vs			<i>O. hirtus</i>		
	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0039	<i>P</i> = 0.0071			
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	94.4 \pm 1.7 a	76.1 \pm 2.6 a	-----	-----	-----	-----			
<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>O. hirtus</i>	88.6 \pm 2.1 a	59.4 \pm 4.1 b	3.9 \pm 0.9 c	7.2 \pm 1.2 c	0.5 \pm 0.3 a	3.9 \pm 0.9 b			
<i>D. longicaudata</i> + <i>O. hirtus</i>	87.7 \pm 1.8 a	61.1 \pm 2.4 b	13.6 \pm 1.8 b	22.2 \pm 1.6 a	2.2 \pm 0.9 a	13.6 \pm 1.8 a			
<i>O. hirtus</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	51.4 \pm 3.3 c	18.1 \pm 2.5 c	2.8 \pm 1.1 c	23.3 \pm 1.7 a	4.1 \pm 1.2 a	2.8 \pm 1.1 b			
Todas las especies juntas*	68.9 \pm 4.1 b	28.9 \pm 2.9 c	41.1 \pm 4.2 a	15.3 \pm 2.3 b	1.9 \pm 0.9 a	12.8 \pm 2.3 a			
<i>O. hirtus</i> (Testigo)	-----	-----	-----	25.3 \pm 2.1 a	3.8 \pm 0.9 a	-----			

**D. longicaudata*, *D. crawfordi*, *U. anastrephae* y *O. hirtus*; \rightarrow = exposición secuencial; + = exposición simultánea. Medias dentro de las columnas y tratamientos seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes mediante el análisis de varianza (ANOVA) y Tukey ($P \leq 0.05$). E.E.= Error Estándar.

Cuadro 2. Porcentaje (\pm EE) de parasitismo y proporción de machos de *D. longicaudata*, *D. crawfordi*, *U. anastrephae* y *O. hirtus* en cada uno de los tratamientos (N= 270 pupas / tratamiento), el parasitismo se calculó como el número de parasitoides que emergieron divididos por el número de parasitoides y moscas que emergieron por cien.

Tratamientos	Parasitismo	Proporción machos	Tratamientos	Parasitismo	Proporción machos
<i>D. longicaudata</i>			vs		
<i>P</i> = 0.0001			<i>P</i> = 0.0003		
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	98.2 \pm 1.2 a	0.29 \pm 0.01 b	<i>D. crawfordi</i> (Testigo)	71.9 \pm 4.3 a	0.46 \pm 0.02 ab
<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>D. crawfordi</i>	97.5 \pm 0.4 a	0.30 \pm 0.01 b	<i>D. crawfordi</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	20.9 \pm 2.8 b	0.45 \pm 0.02 ab
<i>D. longicaudata</i> + <i>D. crawfordi</i>	96.0 \pm 0.9 a	0.31 \pm 0.02 ab	<i>D. crawfordi</i> + <i>D. longicaudata</i>	3.7 \pm 0.8 c	0.26 \pm 0.05 b
<i>D. crawfordi</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	72.7 \pm 2.8 b	0.38 \pm 0.01 a	<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>D. crawfordi</i>	1.5 \pm 0.3 c	0.28 \pm 0.1 b
Todas las especies juntas*	70.7 \pm 2.3 b	0.35 \pm 0.03 ab	Todas las especies juntas*	4.5 \pm 1.0 c	0.54 \pm 0.1 a
<i>D. longicaudata</i>			vs		
<i>P</i> = 0.0001			<i>P</i> = 0.0001		
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	97.7 \pm 0.7 a	0.25 \pm 0.02 b	<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	17.7 \pm 1.4 a	0.45 \pm 0.04 a
<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>U. anastrephae</i>	89.3 \pm 0.9 b	0.23 \pm 0.01 b	<i>U. anastrephae</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	18.2 \pm 1.3 a	0.39 \pm 0.02 a
<i>D. longicaudata</i> + <i>U. anastrephae</i>	93.6 \pm 0.6 a	0.19 \pm 0.02 b	<i>U. anastrephae</i> + <i>D. longicaudata</i>	5.7 \pm 0.4 b	0.42 \pm 0.04 a
<i>U. anastrephae</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	73.3 \pm 1.4 c	0.35 \pm 0.03 a	<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>U. anastrephae</i>	7.9 \pm 0.8 b	0.40 \pm 0.03 a
Todas las especies juntas*	70.7 \pm 2.4 c	0.35 \pm 0.03 a	Todas las especies juntas*	14.3 \pm 1.5 a	0.43 \pm 0.04 a
<i>D. longicaudata</i>			vs		
<i>P</i> = 0.0001			<i>P</i> = 0.0008		
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	97.9 \pm 0.9 a	0.26 \pm 0.01 b	<i>O. hirtus</i> (Testigo)	14.0 \pm 1.9 a	0.51 \pm 0.03 a
<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>O. hirtus</i>	97.3 \pm 0.4 a	0.30 \pm 0.01 b	<i>O. hirtus</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	10.3 \pm 2.4 a	0.50 \pm 0.02 a
<i>D. longicaudata</i> + <i>O. hirtus</i>	94.5 \pm 0.7 a	0.29 \pm 0.02 b	<i>O. hirtus</i> + <i>D. longicaudata</i>	3.7 \pm 0.6 b	0.57 \pm 0.04 a
<i>O. hirtus</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	66.6 \pm 4.4 b	0.40 \pm 0.04 a	<i>D. longicaudata</i> \rightarrow <i>O. hirtus</i>	0.8 \pm 0.2 b	0.36 \pm 0.1 ab
Todas las especies juntas*	70.7 \pm 2.4 b	0.35 \pm 0.1ab	Todas las especies juntas*	1.4 \pm 0.3 b	0.17 \pm 0.1 b

**D. longicaudata*, *D. crawfordi*, *U. anastrephae* y *O. hirtus*; \rightarrow = exposición secuencial; + = exposición simultánea. Medias dentro de las columnas y tratamientos seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes mediante el análisis de varianza (ANOVA) y Tukey ($P \leq 0.05$). E.E.= Error Estándar.

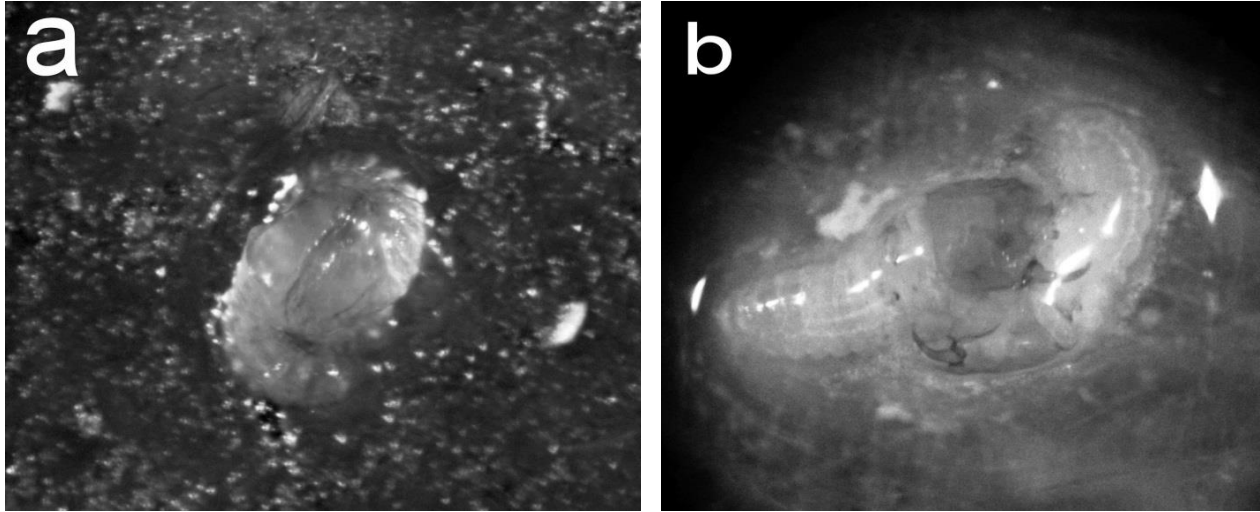


Figura 4. Competencia intrínseca intraespecífica. a) Dos larvas de *D. longicaudata* unida por sus mandíbulas extraídas del interior de una pupa de *A. ludens*; b) Dos larvas de *U. anastrephae* unida por sus mandíbulas extraídas del interior de una pupa de *A. obliqua*. Fotografiadas con una cámara Sony Cyber-shot Carl Zeiss®, utilizando un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, Discovery.V8).

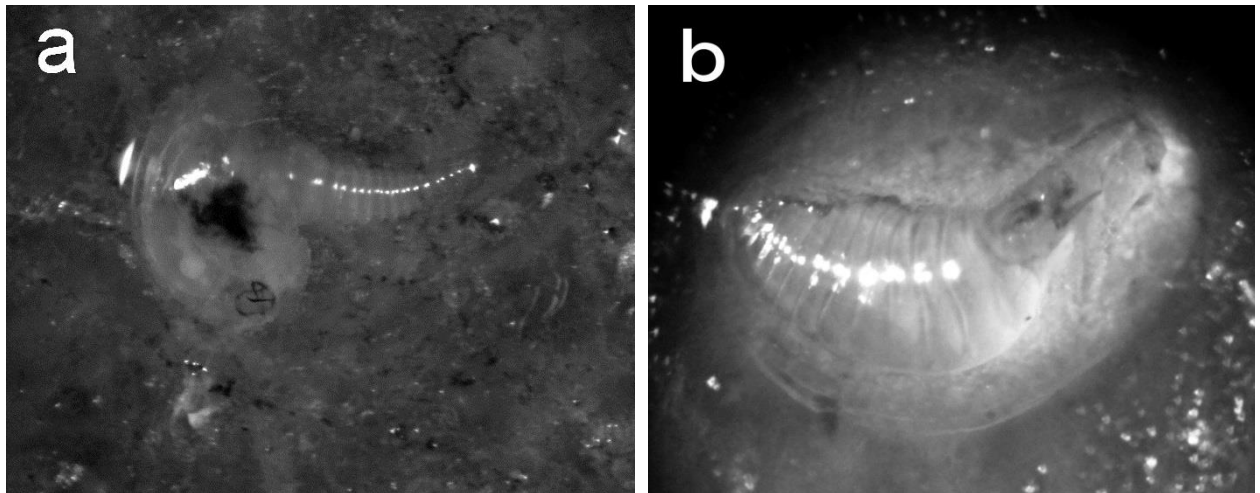


Figura 5. Competencia intrínseca interespecífica. a) Larva de *D. longicaudata* unida por sus mandíbulas al cuerpo de una larva de *O. hirtus* extraídas del interior de una pupa de *A. ludens*; b) Larva de *U. anastrephae* unida por sus mandíbulas al cuerpo de una larva de *D. longicaudata* extraídas del interior de una pupa de *A. obliqua*. Fotografiadas con una cámara Sony Cyber-shot Carl Zeiss®, utilizando un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, Discovery.V8).

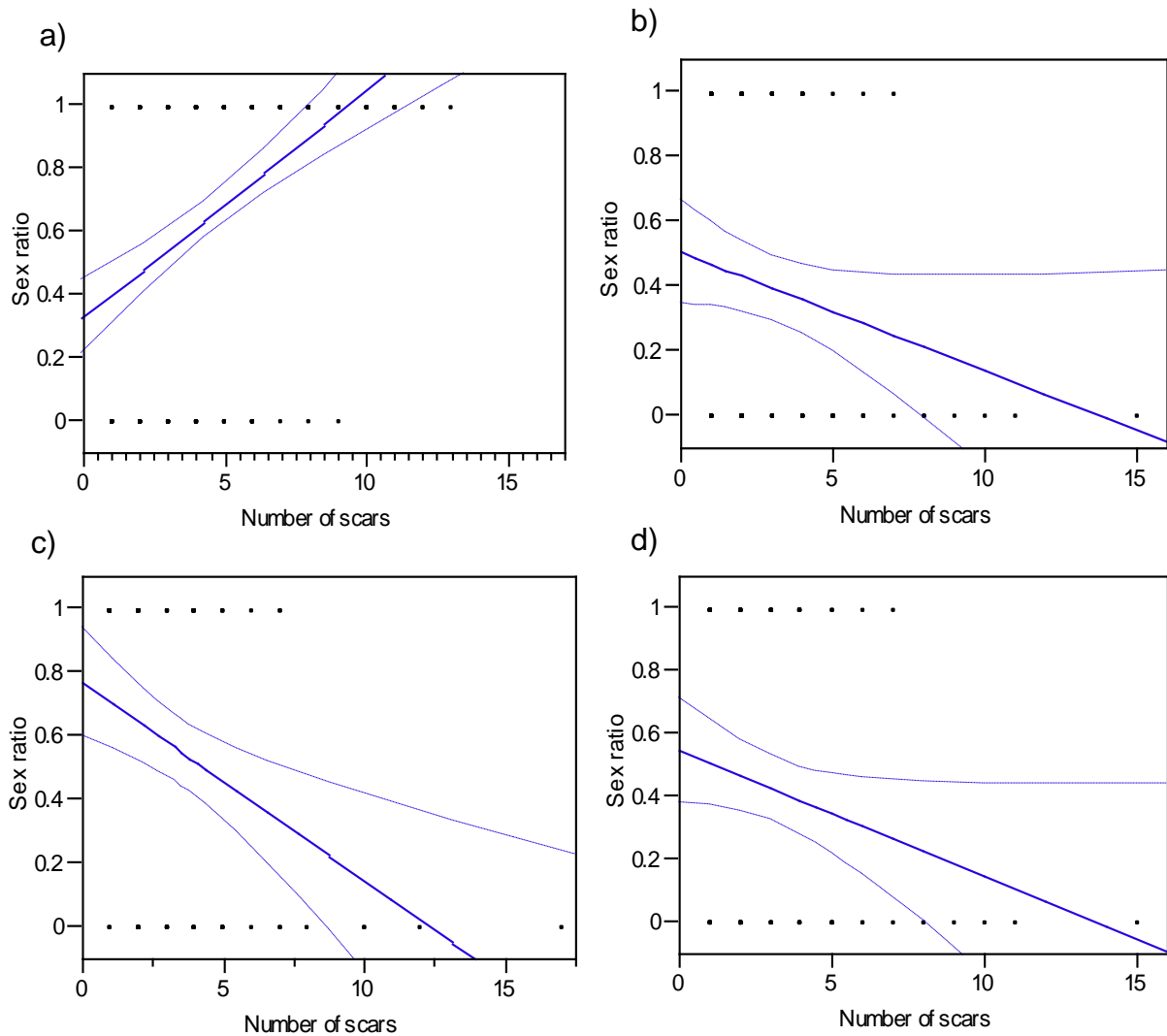


Figura 6. Relación entre la proporción sexual y superparasitismo (número de cicatrices) en datos binarios (1=hembras, 0=machos) en a) *D. longicaudata* (n=145), b) *D. crawfordi* (n=95), c) *U. anastrephae* (n=82) y d) *O. hirtus* (n=90). La línea representa la regresión logística con intervalos de confianza del 95%, e ilustra la probabilidad estimada P , de ser una hembra ($P = \exp(n) / (1 + \exp(n))$), donde para *D. longicaudata* $n = 0.3330695 + 0.0721047 \times$ número de cicatrices; *D. crawfordi* $n = 0.5076419 - 0.0363334 \times$ número de cicatrices; *U. anastrephae* $n = 0.7722324 - 0.0624584 \times$ número de cicatrices; *O. hirtus* $n = 0.551933 - 0.0402551 \times$ número de cicatrices.

4. Discusión

Nuestros resultados demuestran que el parasitismo de cada especie evaluada fue afectado negativamente bajo condiciones de competencia intrínseca interespecífica, independientemente si el rol jugado fue de residente o de invasor. *Diachasmimorpha longicaudata* fue la especie más exitosa pues invariablemente logró porcentajes de parasitismo más elevados que el resto de las especies nativas, lo cual es consistente con lo reportado por Paranhos et al. (2013), en un estudio de confrontaciones de *D. longicaudata* con las especies *D. areolatus* y *U. anastrephae*.

En ausencia de competidores *D. crawfordi* fue la especie nativa con el mayor parasitismo (71.9%), razón por la cual se le ha considerado un candidato para producción masiva y liberaciones aumentativas contra *A. ludens* (Montoya y Cancino 2004; Miranda et al. 2015). Sin embargo, *D. crawfordi* fue la especie más afectada por la presencia de *D. longicaudata*, en su porcentaje de parasitismo en todas las condiciones evaluadas, este hecho indicó una menor competitividad a pesar de ser residente o invasor en el hospedero, así como su bajo rendimiento en pupas parasitadas y multiparasitadas cuando *D. longicaudata* es residente. Lo anterior sugiere el efecto que pueden tener las liberaciones de *D. longicaudata* en ambientes donde naturalmente exista *D. crawfordi*, ya que ambas especies pueden competir por larvas en los frutos de un mismo hospedero (Sivinski et al. 1997), lo cual puede llevar a un desplazamiento competitivo de *D. crawfordi* por *D. longicaudata*. No obstante, existen argumentos sobre una posible distribución de recursos para estas dos especies, señalando que *D. longicaudata* está más adaptado a los ambientes de baja altitud y secos con una gran diversidad de hospederos frutales y especies de moscas, mientras que *D. crawfordi* forrajea mejor en ambientes de zonas altas, frescas y húmedas que pueden contener árboles silvestres de cítricos (Sivinski et al. 2000).

Utetes anastrephae fue la especie nativa menos afectada en su desempeño en comparación a las otras especies nativas, lo cual también fue consistente con lo reportado por Paranhos et al. (2013) cuando se comparó el rendimiento de *U. anastrephae* y *D. areolatus* en competencia con *D. longicaudata*. Sin embargo, hay que destacar el hecho de que en ataque secuencial con *D. longicaudata*, el rendimiento de *U. anastrephae* fue igual a cuando atacó en solitario (=tratamiento testigo), lo que nos

indica que esta especie tiene una alta capacidad de defensa cuando *D. longicaudata* actúa como invasor, lo que sugiere que no sería fácilmente desplazado bajo condiciones naturales (i.e. atacando *A. obliqua* en *Spondias* spp.). Resultados similares se pueden observar en el ataque simultáneo de todas las especies, indicándonos una superioridad intrínseca de *U. anastrephae* en relación al resto de las especies nativas, probablemente debido al tamaño de su larva de primer instar, cuya capsula cefálica y mandíbulas son más grandes a las de otras especies nativas, pero similares a la de *D. longicaudata* (Figura 2), aunado al comportamiento agresivo de esta larva que pudo ser observado en las disecciones de pupas (Figuras 4b y 5b). Esta superioridad intrínseca competitiva de *U. anastrephae* y su mayor resistencia al ataque de *D. longicaudata* podría ayudar a explicar cómo a pesar de ser una especie poco común en México, se ha podido mantener de manera constante en regiones donde abundan *D. areolatus* y *D. longicaudata*.

Opius hirtus fue la especie con el menor desempeño y la más afectada cuando *D. longicaudata* es residente y en competencia simultánea con ésta y todas las especies juntas. Estos resultados demuestran que *O. hirtus* es un competidor intrínseco inferior, situación que puede derivarse de su especialización atacando especies raras de hospederos como *A. cordata* y *A. alveata*, que a su vez infesta a hospederos frutales poco comunes (Hernández-Ortiz et al. 1994; López et al. 1999; Sivinski et al. 2000; Aluja et al. 2003). Este hecho puede generar una competencia intrínseca heteroespecífica menor que favorece la sobrevivencia de su larva de primer instar que posee una capsula cefálica y mandíbulas muy pequeña en comparación a las otras especies evaluadas (Figuras 1b). No obstante esta especie ha sido considerada como un buen competidor extrínseco en el forrajeo cuando los hospederos se encuentran en bajas densidades (García-Medel et al. 2007).

Diachasmimorpha longicaudata fue también la especie con mayor porcentaje de pupas superparasitadas en todos los tratamientos evaluados, lo cual podría ser correlacionado positivamente con la ventaja competitiva que mostró sobre el resto de las especies evaluadas. En diferentes trabajos (González et al. 2007; Montoya et al. 2011; 2013) se ha sugerido que la presencia del superparasitismo en *D. longicaudata* podría representar una ventaja adaptativa, ya que éste se ha relacionado positivamente

con una proporción sexual favorable a hembras, sugiriendo que la emergencia de hembras bajo condiciones superparasíticas se puede deber a una capacidad competitiva intrínseca superior de éstas (Montoya et al. 2011). En este trabajo también se observó esta condición (Figura 6), lo cual resultó completamente contrastante con los resultados obtenidos con las tres especies nativas de parasitoides, ya que éstas presentaron, además de una baja proporción de pupas superparasitadas, una relación inversa entre el número de cicatrices con la emergencia de hembras.

Los hechos referidos en el párrafo anterior nos sugieren que la especie exótica y las especies nativas evaluadas aquí han desarrollado estrategias adaptativas diferentes en torno a la selección de hospederos, en donde las especies nativas parecen mostrar una mayor capacidad de discriminación intraespecífica, ya que las hembras evitan poner huevos que producirán hijas en huéspedes considerados de baja calidad, lo cual se puede relacionar directamente con el tamaño del hospedero y/o con su parasitación previa por conespecíficos (Charnov 1982; King 1993; Godfray 1994). Las altas proporciones de pupas multiparasitadas nos indican que la discriminación heteroespecífica es más elusiva para las especies aquí evaluadas, lo cual se puede atribuir a la dificultad que se tiene de reconocer las señales químicas dejadas por los heteroespecíficos, ya que la mayoría de los parasitoides tienden a reconocer sus propias marcas o las dejadas por los conespecíficos (Nufio y Papaj 2001; Van Alphen y Visser 1990). Una excepción a lo anterior lo parece constituir la relación entre *O. hirtus* y *D. longicaudata* donde ambas especies registraron los porcentajes más bajos de multiparasitismo.

De acuerdo con nuestros resultados podemos concluir que *D. longicaudata* es un competidor intrínseco superior a *D. crawfordi*, *U. anastrephae* y *O. hirtus* ya sea que actúe como residente o invasor. También fue la única especie que mantuvo una proporción sexual favorable a hembras en todas las condiciones bajo evaluación, lo cual lo ratifica como un enemigo natural altamente elegible en programas de control biológico por aumento. *U. anastrephae* fue la especie nativa que resultó menos afectada por la presencia competitiva de *D. longicaudata*, lo cual sugiere que podría ser utilizado como un agente de control biológico complementario contra moscas de la fruta del género *Anastrepha*.

Agradecimientos

A Javier Valle-Mora (ECOSUR) por la asistencia en los análisis estadísticos. A Jorge Cancino y Patricia López (Lab. Control Biológico, Programa MOSCAFRUT) por su apoyo técnico y a la Planta Moscafrut (SAGARPA-IICA) por el suministro del material biológico. Este estudio recibió financiamiento a través del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT Proyecto No. 24031. Se agradece al CONACYT por la beca otorgada a Félix D. Murillo para sus estudios de Doctorado.

Literatura citada

- Aluja M, Ovruski SM, Sivinski J, Córdova-García G, Schliserman P, Núñez-Campero SR, Ordano M (2013) Inter-specific competition and competition-free space in the tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecological Entomology* 38: 485–496
- Aluja M, Sivinski J, Ovruski S, Guillén L, López M, Cancino J, Torres-Anaya A, Gallegos-Chan G, Ruíz L (2009) Colonization and domestication of seven species of native New World hymenopterous larval-prepupal and pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. *Biocontrol Science and Technology* 19: 49-79
- Aluja M, Rull J, Sivinski J, Norrbom AL, Wharton RA, Macías-Ordoñez R, Díaz-Fleischer F, López M (2003) Fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) and associated native parasitoids (Hymenoptera) in the tropical rainforest biosphere reserve of Montes Azules, Chiapas, Mexico. *Environmental Entomology* 32: 1377-1385
- Aluja M, Guillen J, Liedo P, Cabrera M, Ríos E, De la Rosa G, Celedonio H, Mota D (1990) Fruit infesting Tephritids [Dip.: Tephritidae] and associated parasitoids in Chiapas, Mexico. *Entomophaga* 35 (1): 39-48
- Ayala A, Martínez AM, Figueroa I, Pineda S, Miranda M, Liedo P, Montoya P (2014) Superparasitism strategies by a native and an exotic parasitoid species attacking the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology* 24: 925–935

- Charnov EL (1982) The theory of sex allocation. Princeton University Press, Princeton
- Fisher R (1961) A study in insect mutiparasitism II. The mechanism and control of competition for possession of the host. *Journal of Experimental Biology* 38: 605-628
- García-Medel D, Sivinski J, Díaz-Fleischer F, Ramírez-Romero R, Aluja M (2007) Foraging behavior by six fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) released as single- or multiple-species cohorts in field cages: influence of fruit location and host density. *Biological Control* 43:12-22
- Griffiths N, Godfray H (1988). Local mate competition, sex ratio and clutch size in bethylid wasps. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 22: 211-217
- Godfray HCJ (1994) Parasitoids behavioral and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton
- González PI, Montoya P, Perez-Lachaud G, Cancino J, Liedo P (2007) Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 40: 320–326
- Hernández- Ortiz V, Perez-Alonzo R, Wharton R (1994) Native parasitoids associated with the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Entomophaga* 39: 171-178
- King BH (1993) Sex ratio manipulation by parasitoid wasps. In: Wrensch DL, Ebberte M (eds) *Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. Chapman and Hall, New York, p. 418-441
- López M, Aluja M, Sivinski J (1999) Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biological Control* 15: 119–129
- Miranda M, Sivinski J, Rull J, Cicero L, Aluja M (2015) Niche breadth and interspecific competition between *Doryctobracon crawfordi* and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), native and introduced parasitoids of *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 82: 86–95

- Montoya P, Ruiz L, Pérez-Lachaud G, Cancino J, Liedo P (2013) Field superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* attacking *Anastrepha* spp. larvae on mango fruits. *Biological Control* 64: 160-165
- Montoya P, Pérez-Lachaud G, Liedo P (2012) Superparasitism in the Fruit Fly Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) and the Implications for Mass Rearing and Augmentative Release *Insects* 3: 900-911
- Montoya P, Cancino J, Pérez-Lachaud G, Liedo P (2011) Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. *BioControl* 56: 11-17
- Montoya P, Cancino J, Zenil M, Santiago G, Gutierrez JM (2007) The Augmentative Biological Control Component in the Mexican National Campaign Against *Anastrepha* spp. *Fruit Flies in: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J (eds.), Area-Wide Control of Insect Pests*, p. 661–670
- Montoya P, Cancino J, Zenil M, Gomez E, Villaseñor A (2005) Parasitoid releases in the control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) outbreaks, in coffee growing zones of Chiapas, Mexico. *Vedalia* 12: 85-89
- Montoya P, Cancino J (2004) Control biológico por aumento de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) *Folia Entomológica Mexicana* 43: 257-270
- Montoya P, Benrey B, Barrera JF, Zenil M, Ruiz L, Liedo P (2003) Oviposition behavior and conspecific host discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid. *Biocontrol Science and Technology* 13: 683–690
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M (2000a) Biological Control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Mango Orchards through Augmentative Releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 18: 216–224
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Barrera JF, Cancino J, Aluja M (2000b) Functional Response and Superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a Parasitoid of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93: 47-54

- Murillo FD, Liedo P, Nieto-López MG, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Montoya P (2016) First instar larvae morphology of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) fruit flies. Implications for interspecific competition. *Arthropod Structure & Development*. doi:10.1016/j.asd.2016.01.003
- Murillo FD, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Liedo P, Montoya P (2015) *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Journal of Hymenoptera Research* 46: 91–105
- Nufio C, Papaj DR (2001) Host-marking behavior in phytophagous insects and parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99: 273-293
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R (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. *Integrated Pest Management Reviews* 5: 81–107
- Palacio IP, Ibrahim AB, Ibrahim R (1991) Interspecific competition among opiinae parasitoids of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *The Philippine Entomologist* 8: 1087–1097
- Paranhos BJ, Sivinski J, Stuhl C, Holler T, Aluja M (2013) Intrinsic Competition and Competitor-Free-Space Influence the Coexistence of Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of Neotropical Tephritidae (Diptera). *Environmental Entomology* 42: 717-723
- Pedersen BS, Mills NJ (2004) Single vs. multiple introduction in biological control: the roles of parasitoid efficiency, antagonism and niche overlap. *Journal of Applied Ecology* 41: 973–98
- Ramadan M, Wong T, Herr J (1994) Is the Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) a natural host for the opiine parasitoid *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera Braconidae)? *Environmental Entomology* 23: 761-769
- Salt G (1961) Competition among insect parasitoids. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 15: 96-119
- SAS Institute (2008) SAS 9.4 online documentation. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

- Sivinski J, Vulinec K, Aluja M (2001) Ovipositor length in a guild of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) attacking *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) in southern Mexico. *Annals of the Entomological Society of America* 94: 886–895
- Sivinski JM, Piñero J, Aluja M (2000) The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control* 18: 258-269
- Sivinski J, Aluja M, Holler T, Eitam A (1998) 'Phenological Comparison of Two Braconid Parasitoids of the Caribbean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae)'. *Environmental Entomology* 27: 360-365
- Sivinski J, Aluja M, López M (1997) 'Spatial and Temporal Distributions of Parasitoids of the Mexican *Anastrepha* Species (Diptera: Tephritidae) Within the Canopies of Fruit Trees'. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 604-618
- Sivinski JM, Calkins CO, Baranowsky R, Harris D, Brambila J, Diaz J, Burns RE, Holler T, Dodson D (1996) Suppression of Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) Diptera: Tephritidae) population through augmented releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 6: 177–185
- Van Alphen JJM, Visser ME (1990) Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*. 35: 59-79
- Wang XG, Bokonon–Ganta A, Messing R (2008) Intrinsic inter-specific competition in a guild of tephritid fruit fly parasitism: effects of co-evolutionary history on competitive superiority. *Biological Control* 44: 312-320
- Wharton RA, Marsh P (1978) New world Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitic on Tephritidae (Diptera). *Journal - Washington Academy of Sciences* 68: 147-167
- Wilson K y Hardy ICW (2002) Statistical analysis of sex ratios: an introduction. *Sex Ration Concepts and Research Methods* (ed. Hardy ICW) Cambridge University Press, Cambridge. Pp 48-92

CAPITULO II

First instar larvae morphology of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) fruit flies. Implications for interspecific competition

Félix D. Murillo^a, Pablo Liedo^a, María Guadalupe Nieto-López^a, Héctor Cabrera-Mireles^a, Juan F. Barrera^a
and Pablo Montoya^b

^a El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antiguo Aeropuerto Km 2.5, Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico.

^b Programa Moscafrut, SAGARPA-SENASICA. Camino a los Cacaotales S/N, Metapa de Domínguez, CP 30860, Chiapas, México.

Corresponding author: Félix D. Murillo (El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antiguo Aeropuerto Km 2.5, Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico. Phone +52 1 229 9377062. fmurillo@ecosur.edu.mx).

Abstract

The morphology of the first instars of the Opiinae braconids *Diachasmimorpha longicaudata*, *Doryctobracon areolatus*, *Doryctobracon crawfordi*, *Utetes anastrephae* and *Opius hirtus* (the first is exotic, and the others are natives to Mexico), parasitoids of *Anastrepha* fruit flies, are described and compared. The possible implications on interspecific competition among these species are discussed. The most significant adaptations found were: (1) the mouth apparatus, where the large mandibles and fang-shaped maxillary lobes present in *D. longicaudata* and *U. anastrephae* larvae were absent in *O. hirtus*, *D. areolatus* and *D. crawfordi* larvae, and (2) the degree of mobility for exploration and escape, such as the lateral and caudal appendages that were only present in *D. longicaudata* (ventrolateral appendages in the base of the cephalic capsule), *U. anastrephae* (caudal lobe with two appendages) and *D. areolatus* (caudal lobe with a round apex with a globular shape). The first instar larvae of the species *D. longicaudata* show morphological adaptations that apparently confer competitive advantages against the larvae of *D. areolatus*, *D. crawfordi* and *O. hirtus*. However, the first instar larvae of *U. anastrephae* show larger mandibles, an adaptation that could enable this species to resist competition from *D. longicaudata*.

Keywords: morphology, *Diachasmimorpha longicaudata*, *Doryctobracon areolatus*, *Doryctobracon crawfordi*, *Utetes anastrephae*, *Opius hirtus*, interspecific competition

1. Introduction

The guild of native parasitoids attacking fruit flies of the genus *Anastrepha* (Schiner) in the Neotropical region is mainly composed of a group of solitary endoparasitoid koinobionts, mostly of the family Braconidae, that oviposit in the host larvae and emerge from pupae. The species *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti 1911), *Doryctobracon crawfordi* (Viereck 1911), *Utetes anastrephae* (Viereck 1913) and *Opius hirtus* (Fischer 1963) are notable due to their abundance (López et al., 1999; Ovruski et al., 2000). Exotic species constitute 18% of the parasitoid guild, including the species *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Wharton, 1987), which stands out due to its frequency of occurrence since its introduction via biological control programs (Aluja et al., 1990; Sivinski et al., 2000; Ovruski et al., 2000).

The competitive interactions among species of Opiinae targeting fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) tend to have a greater effect on native species than on exotic species (Sivinski et al., 1997; Pedersen and Mills, 2004) through indirect or direct interactions (Boivin and Brodeur, 2006). Indirect competition can be through oviposition-detering pheromones (Boivin and Brodeur, 2006). Direct competition can be extrinsic, such as when parasitoid females confront other females for access to hosts (Griffiths and Godfray, 1988), and intrinsic, when parasitoid larvae compete for nutrients or space within the host (Silvers and Nappi, 1986).

During intrinsic competition, parasitoid larvae can induce physiological changes within the host to destroy eggs of competitors (Fisher, 1961) or can use their mandibles or caudal appendages, which are typical in certain mobile first instar larvae, to physically attack other larvae (Salt, 1961). The locomotive, protection, attack, ingestion and respiratory functions of parasitoid larvae are expressed through morphological characteristics (Hagen, 1964). For example, a well-developed caudal appendage allows the larvae to swim through the host's hemolymph, which may be an adaptation allowing them to raise the probability of finding conspecific or heterospecific larvae that may be then attacked and destroyed (Harvey et al., 2013). Large mandibles or caudal appendages typical of several mobile larvae species provide an advantage in the competition between parasitoid larvae (Salt, 1961). The size of the larvae of a parasitoid, the relative time since oviposition and the condition of the host are

determining factors in the survival of a species under intrinsic competition (Fisher, 1961; Mills, 2003; Wang and Messing, 2003).

Morphological studies on the preimaginal stages of fruit fly parasitoids have been few (Tormos et al., 2009; Carabajal-Paladino et al., 2010; Tormos et al., 2013) despite the significance of morphological characteristics in competitive interactions among parasitoid species (Aluja et al., 2013) and the advantages that could be gained by identifying insects before emergence into adulthood, which could make it easier to quantify the impact of natural enemies on these species in biological control programs (Llácer et al., 2005; Onagbola and Fadamiro, 2008).

The aim of the present study was to describe and compare the morphology of first instar larvae of five braconid Opiinae parasitoid species (four native and one exotic to the Neotropics) that target fruit flies of the genus *Anastrepha* and discuss the implications of this morphology on interspecific competition.

2. Materials and methods

2.1. Study areas and biological material

This study was carried out at three locations; field sampling and rearing in the Medellín de Bravo municipality in the central region of Veracruz, Mexico; host larval dissections at the biological control laboratory of the MOSCAFRUT facility in Metapa, Chiapas; image processing and analysis at the Scanning Electron Microscopy Laboratory of ECOSUR in Tapachula, Chiapas.

A total of 50 first instar larvae from each parasitoid species, *D. longicaudata*, *D. crawfordi*, *U. anastrephae*, *O. hirtus* and *D. areolatus* were used. The first four species were collected from pupae of *Anastrepha ludens* (Loew) at 3 days of age. The *A. ludens* pupae were kindly provided by the parasitoid rearing laboratory of the MOSCAFRUT facility. Larvae of *D. areolatus* were obtained from third instar *Anastrepha obliqua* (Macquart) larvae, which were obtained from Hog Plums (*Spondias mombin* L.) collected in the field in Dos Postes, Medellín de Bravo, Veracruz.

2.2. Stereomicroscopy

Utilizing a Carl Zeiss Smz -168® stereo microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany), 30 *A. obliqua* larvae and 30 *A. ludens* pupae were dissected in order to obtain late first instar larvae of the abovementioned parasitoid species.

Permanent preparations of parasitoid larvae were performed and mounted on slides using Hoyer's medium to facilitate the measurement of head capsules and mandibles. Larvae, head capsules and mandibles were photographed at 5x using a Motic 2.0® digital camera and measured afterward using the Motic Images Plus 2.0 Software.

2.3. Scanning Electron Microscopy

Twenty larvae of *A. obliqua* and 20 pupae of *A. ludens* were dissected to allow collection of late first instar larvae of the studied parasitoid species. During extraction, *Anastrepha* larvae were kept submerged in a sterile saline solution, which was also used to wash the parasitoid larvae four to five times to eliminate any remaining residue of the host's haemolymph. The parasitoid larvae were fixed for 1 h in hot (50-60°C) fixing solution (1% formaldehyde, 3% glutaraldehyde, 0.2 M sucrose, 0.1 M simulated body fluid (SBF) pH 7.3). They were later transferred to a 2% glutaraldehyde, 5% DMSO, 0.1 M SBF pH 7.3 solution and incubated for 24 h (Hayat, 1981). Afterward, they were dehydrated through ethanol changes (50, 70, 90 and 100%) every 2 h. The samples were CO₂ critical point dried in an SPI SUPPLIES model SPI-DRY CPD® dryer. The mounting was performed on aluminum cylinders using conductive carbon adhesive tape, with the samples being covered with a gold-palladium layer approximately 20 nm in thickness, using a DENTON VACUUM, model DESK II®. The samples were analyzed under a scanning electron microscope (SEM) under high vacuum and 8 kV acceleration conditions (TOPCON, model SM-510®). Larvae were thoroughly scanned and photographed.

2.4. Data analysis

The visible stereoscopic characteristics were used in the general description of larval body and dimensions. The SEM observations were used to describe specific details and dimensions and to confirm the data obtained from stereomicroscopy. Measurements are given as mean values \pm SE. Body length did not include the head capsule, body width was measured considering the points of maximum distance, head capsule length did not include the mandibles, and cephalic width was measured considering the points with the maximum distance. An analysis of variance and a Tukey's range test ($P = 0.05$) were performed to compare the dimensions of the larvae using the Statistical Analysis System (SAS Institute, 2008).

3. Results

3.1. Larval descriptions

D. longicaudata (Ashmead).

Appearance. Cycloform type larva (Quicke, 1997), with resilient and muscled cuticle. Well-defined head, translucent body, caudate and vermiform, with marked segmentation as described in Carabaja-Paladino et al. (2010), and 12 body segments (Figure 1a). *Body.* 736.9 ± 0.01 μm in length and 169.0 ± 0.003 μm in width. Last abdominal segment with a well-differentiated caudal lobe (cl) in the shape of a small and robust tail (≈ 75.0 μm in length) (Figure 1a). Integument with microspinules (ms) measuring 0.96 ± 0.04 μm in length (Figure 1b). *Head capsule.* Large in relation to body and strongly sclerotized, wider rather than longer at base (Figure 1c), as described in Carabajal-Paladino et al. (2010). Measures 283.1 ± 0.004 μm in length and 312.6 ± 0.005 μm in width. Rudimentary antennae with two long chaetae present in posterior part and from ventral base of head capsule two appendages (ap) in the shape of small arms emerge (≈ 109.3 μm long \times ≈ 29.6 μm wide) (Figure 1c). *Mandibles.* Large and very sclerotized (ma), as detailed in Carabajal-Paladino et al. (2010), 130.1 ± 0.002 μm in length and 36.1 ± 0.001 μm wide at base. A pair of double papillae (dp) present in upper section

around mouth, with a pair of wide chaetae on each papilla, serrated jaw (sj) with fang-shaped maxillary lobes ($\approx 32.0 \mu\text{m}$ in length) and two pairs of long chaetae (Figure 1c).

D. crawfordi (Viereck).

Appearance. Larva inflexible and largely inactive, of hymenopteriform type (Quicke, 1997), not particularly robust appearance and fragile cuticle. Body transparent, small and lightly segmented, well-defined head and 12 body segments (Figure 1d). *Body.* $881.9 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in length and $318.7 \pm 0.005 \mu\text{m}$ in width. Last abdominal segment lacking caudal appendage (Figure 1d) and integument with microspinules (ms) measuring $1.3 \pm 0.05 \mu\text{m}$ in length (Figure 1e). *Head capsule.* Retractable, sclerotized and of rectangular shape (Figure 1f). Measures $125.4 \pm 0.002 \mu\text{m}$ in length and $203.8 \pm 0.004 \mu\text{m}$ in width, with a dorsal integument band widest at the edges. *Mandibles.* Of medium size and sclerotized (ma), $91.4 \pm 0.002 \mu\text{m}$ in length and $33.1 \pm 0.001 \mu\text{m}$ in wide at base. Maxilla smooth, with small cusp (sc) and salivary gland opening (sgo) in central part, a pair of double papillae (dp) in the upper part around mouth and labial chaetae (lc) in inferior part (Figure 1f).

D. areolatus (Szépligeti).

Appearance. Vesiculate and polypodiform type larvae (Quicke, 1997), muscled but with fragile cuticle. Body transparent, long, cylindrical, caudate and vermiform, with weak segmentation. Well-defined head and 12 body segments (Figure 2a). *Body.* $1709.3 \pm 0.04 \mu\text{m}$ in length and $297.8 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in width. Last abdominal segment with well-differentiated, tail-shaped caudal lobe (cl) ($\approx 184.3 \mu\text{m}$ in length) having a rounded apex of globular shape (Figure 2a). Ventrolateral papilla (vp) present in the third body segment ($\approx 8.3 \mu\text{m}$ in length), which is striated and of triangular shape (Figure 2b). Microspinules in integument absent. *Head capsule.* Retractable, lightly sclerotized and small. Shape rectangular measuring $88.6 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in length and $159.1 \pm 0.001 \mu\text{m}$ in width (Figure 2c). With dorsal integument band. *Mandibles.* Small, sclerotized and well-defined (ma), $58.5 \pm 0.001 \mu\text{m}$ in length and $21.1 \pm 0.001 \mu\text{m}$ in width at base, with smooth maxilla and a pair of double papillae (dp) in upper part around mouth (Figure 2c).

U. anastrephae (Viereck).

Appearance. Hymenopteriform type larvae (Quicke, 1997), robust and with thick cuticle. Body transparent, weakly segmented, with well-defined head and 12 body segments (Figure 2d). *Body.* $1223.9 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in length and $413.4 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in width. Last abdominal segment with well-differentiated, tail-shaped, caudal lobe (cl) ($49.1 \mu\text{m}$ long), from which emerge two small appendages (sa) ($36.2 \mu\text{m}$ long) (Figure 2d). Integument with microspinules (ms) measuring $1.2 \pm 0.02 \mu\text{m}$ (Figure 2e). *Head capsule.* Non-retractable, very sclerotized and large. Rectangular shaped and $242.7 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in length and $290.7 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in width (Figure 2f). Without dorsal integument band. *Mandibles.* Large and strongly sclerotized (ma), $195.7 \pm 0.005 \mu\text{m}$ in length and $52.7 \pm 0.002 \mu\text{m}$ in wide at base). With a pair of double papillae (dp) in upper part around mouth, large chaetae present on each papilla and one on base, jaw with fang-shaped maxillary lobes (ml) ($37.5 \mu\text{m}$ in length) (Figure 2f).

O. hirtus (Fischer).

Appearance. Hymenopteriform type larvae (Quicke, 1997), with an apparently fragile cuticle. Body transparent and broad, with weak segmentation, well-defined head and 12 body segments (Figure 3a). *Body.* $1198.2 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in length and $435.5 \pm 0.005 \mu\text{m}$ in width. Lacking a caudal appendage (Figure 3a). Integument with microspinules (ms) measuring $1.5 \pm 0.06 \mu\text{m}$ long (Figure 3d). *Head capsule.* Retractable, small and unsclerotized, $90.8 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in length and $159.1 \mu\text{m}$ in width (Figure 3c). Lacking dorsal integument band. Hypostome, pleurostome and epistome are notably sclerotized, forming internal structure in shape of a mask. *Mandibles.* Small and very sclerotized (ma), $39.9 \pm 0.001 \mu\text{m}$ in length and $14.6 \pm 0.001 \mu\text{m}$ in width at base. With four depressions in labrum having long chaeta (lc) in each depression and four maxillary chaetae (mc) ($4.0 \mu\text{m}$ in length) (Figure 3c).

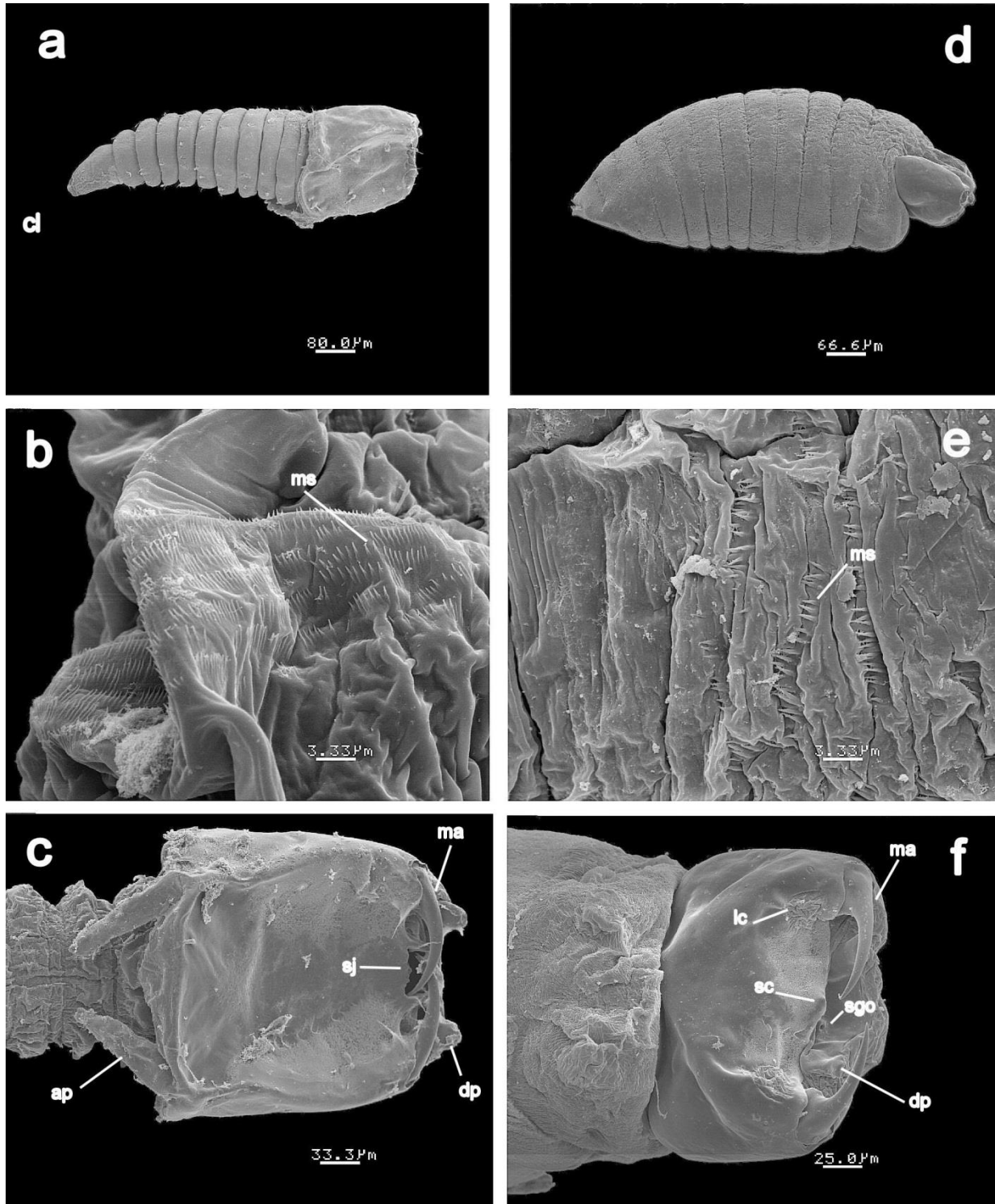


Figure 1. *Diaschamimorpha longicaudata* (a-c). a) First instar larva with caudal lobe, b) integument with microspinules, c) head capsule and mandibles; *Doryctobracon crawfordi* (d-f). d) First instar larva lacking caudal appendage, e) integument with microspinules, f) head capsule and mandibles. Caudal lobe (cl), microspinules (ms), appendages (ap), mandibles (ma), double papillae (dp), serrated jaw (sj), small cusp (sc), salivary gland opening (sgo), labial chaetae (lc).

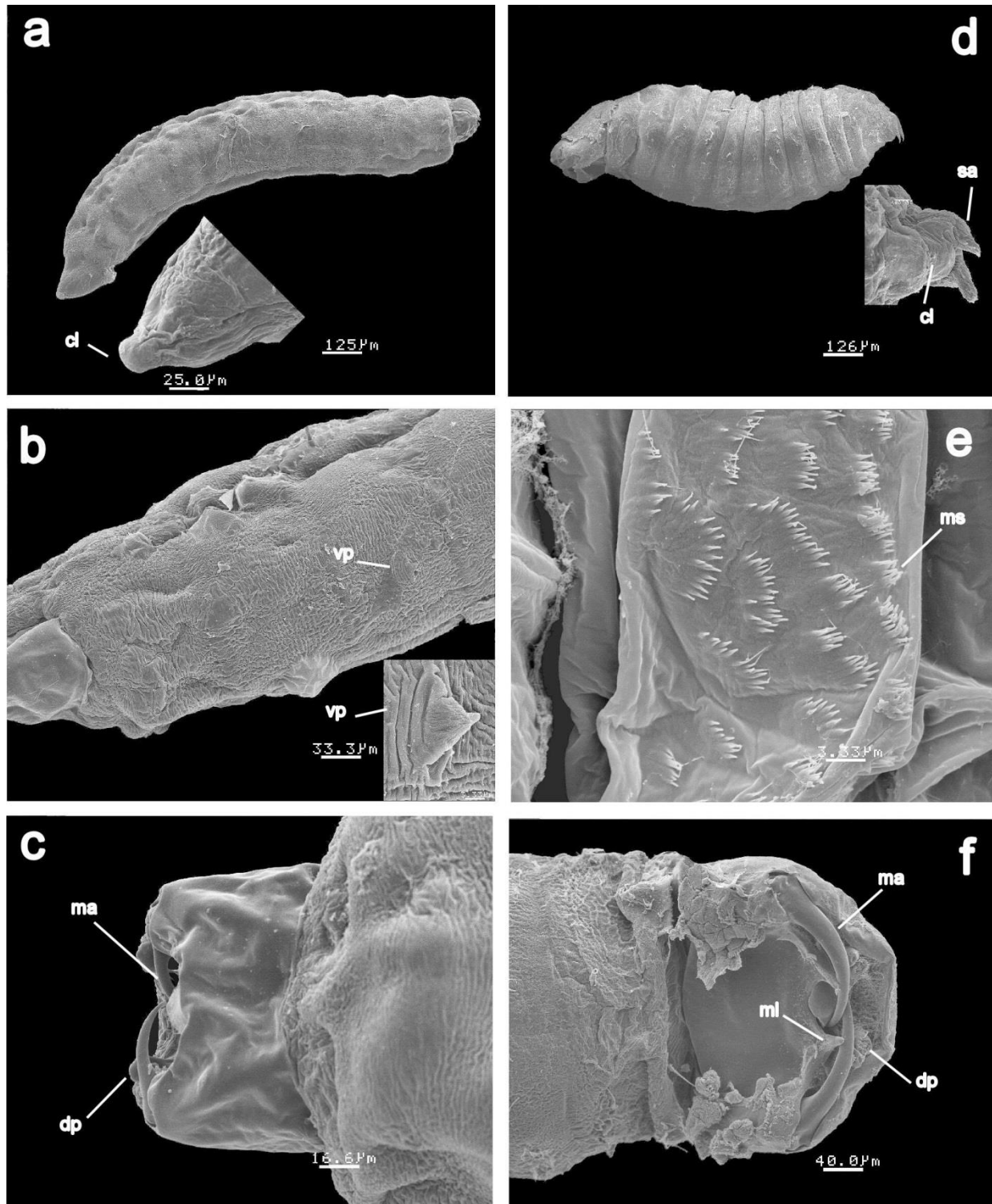


Figure 2. *Doryctobracon areolatus* (a-c). a) First instar larva with body large, cylindrical and caudate, b) ventrolateral papilla present in the body, c) head capsule and mandibles; *Utetes anastrephae* (d-f). d) First instar larva with caudal lobe, e) integument with microspicules, f) head capsule and mandibles. Caudal lobe (cl), ventrolateral papilla (vp), mandibles (ma), double papillae (dp), small appendages (sa), microspicules (ms), maxillary lobes (ml).

3.2. Comparison of larval morphology

The body and head capsule of *D. longicaudata* first instar larvae (Figure 1a and c) are completely different when compared to other species. The *D. areolatus* body shape (long and of cylindrical shape) (Figure 2a) is different from the robust body shape of other native parasitoids (Figures 1d, 2d and 3a), as described in Aluja et al. (2013) in comparison with *U. anastrephae* larvae. However, the head capsule of *D. areolatus* is similar in shape to that of *D. crawfordi* (Figures 1f and 2c). The appearance of *U. anastrephae* and *D. crawfordi* larvae is very similar, but with different dimensions (Figures 1d and 2d). The body shape of *O. hirtus* is similar to that of *U. anastrephae* and *D. crawfordi* (Figures 1d, 2d and 3a), but the head capsule of *O. hirtus* is completely different from all other species (Figures 1c, 1f, 2c, 2f and 3c).

Parasitoid species that are smaller as adults, such as *U. anastrephae* and *O. hirtus*, turned out to have the largest larvae in both length and width compared with *D. crawfordi* and *D. longicaudata* (Table 1). *D. areolatus* larvae were the longest, but thinnest, among the studied species (Table 1). Larvae of *D. longicaudata* were significantly smaller and thinner in comparison with the other parasitoid species (Table 1).

Table 1. Average (\pm S.E.) length and width (μm) of the body of fruit fly (*Anastrepha* spp.) first instar parasitoid larvae (Braconidae: Opiinae). Measured through a stereomicroscope (5x).

Species	Length $P = 0.0001$	Width $P = 0.0001$
<i>Doryctobracon areolatus</i>	1708.69 \pm 0.04 a	297.81 \pm 0.01 b
<i>Utetes anastrephae</i>	1223.88 \pm 0.01 b	413.44 \pm 0.01 a
<i>Opius hirtus</i>	1198.22 \pm 0.01 b	435.55 \pm 0.005 a
<i>Doryctobracon crawfordi</i>	883.86 \pm 0.01 c	318.72 \pm 0.005 b
<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	736.97 \pm 0.01 d	169.0 \pm 0.003 c

Mean values in the columns and parasitoid species followed by different letters are significantly different as analyzed by ANOVA and Tukey's test ($P \leq 0.05$). S.E., standard error, $n = 30$.

The head capsule of *D. longicaudata* larvae was the largest, followed by that of *U. anastrephae*, which were significantly larger than those of *D. crawfordi*, *O. hirtus* and *D. areolatus* (Table 2). The head capsule of *O. hirtus* and *D. areolatus* were statistically equal in length but different in width (Table 2).

Table 2. Average (\pm S.E.) length and width (μm) of the head capsule of fruit fly (*Anastrepha* spp.) first instar parasitoid larvae (Braconidae: Opiinae). Measured through a stereomicroscope (5x).

Species	Length <i>P</i> = 0.0001	Width <i>P</i> = 0.0001
<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	283.11 \pm 0.004 a	312.61 \pm 0.005 a
<i>Utetes anastrephae</i>	242.79 \pm 0.01 b	287.78 \pm 0.01 b
<i>Doryctobracon crawfordi</i>	125.45 \pm 0.002 c	203.84 \pm 0.004 c
<i>Opius hirtus</i>	90.78 \pm 0.01 d	116.89 \pm 0.003 e
<i>Doryctobracon areolatus</i>	88.64 \pm 0.01 d	159.14 \pm 0.001 d

Mean values in the columns and parasitoid species followed by different letters are significantly different as analyzed by ANOVA and Tukey's test ($P \leq 0.05$). S.E., standard error, $n = 30$.

The mandibles of *U. anastrephae* larvae were the largest (Table 3), as reported by Aluja et al. (2013), when compared to those of *D. areolatus*. The *D. longicaudata* larvae possessed the second largest set of mandibles (Table 3). The mandibles of *D. crawfordi* were statistically equal to *D. longicaudata* but were significantly shorter in length (Table 3). *O. hirtus* and *D. areolatus* have significantly smaller mandibles than other species (Table 3).

Table 3. Average (\pm S.E.) length and width (μm) of the mandible of fruit fly (*Anastrepha* spp.) first instar parasitoid larvae (Braconidae: Opiinae). Measured through a stereomicroscope (5x).

Species	Length <i>P</i> = 0.0001	Width <i>P</i> = 0.0001
<i>Utetes anastrephae</i>	195.7 \pm 0.005 a	52.78 \pm 0.002 a
<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	130.1 \pm 0.002 b	36.12 \pm 0.001 b
<i>Doryctobracon crawfordi</i>	97.5 \pm 0.002 c	33.17 \pm 0.001 b
<i>Doryctobracon areolatus</i>	58.5 \pm 0.001 d	21.14 \pm 0.001 c
<i>Opius hirtus</i>	39.9 \pm 0.001 e	14.59 \pm 0.001 d

Mean values in the columns and parasitoid species followed by different letters are significantly different as analyzed by ANOVA and Tukey's test ($P \leq 0.05$). S.E., standard error, $n = 30$.

4. Discussion

The most significant adaptations found in the first instar larvae of the parasitoid species analyzed in this study were those related to the mouth apparatus and those related to sensory and mobile capacity. Those adaptations related to the mouth apparatus, such as the mandibles, are needed for egg hatching and obtain the necessary food to progress into the next larval stage. They may also be used in physical combat against competitors in conditions of superparasitism or multiparasitism (Godfray, 1994; Quicke,

1997; Wang and Messing, 2003; Wang et al., 2008). The large mandibles and fangs on the maxillary lobes of *D. longicaudata* and *U. anastrephae* larvae, are absent in *O. hirtus*, *D. areolatus* and *D. crawfordi* larvae. Those adaptations related to the sensory and mobile capacity and that are used for exploration and escape include the maxillary and labial palps, integument differentiations covering the body (chaetae, spines, spinules and microspinules) and caudal or lateral appendages. No large differences in maxillary palps and the presence of microspinules exist between species, although there were differences in caudal or lateral appendages, which were present only in *D. longicaudata* (ventrolateral appendages in the base of the head capsule), *U. anastrephae* (caudal lobe with two appendages) and *D. areolatus* (caudal lobe with a globular-shaped round apex).

D. longicaudata has a wide range of host species (López et al., 1999; Ovruski et al., 2000), which increases the risk of facing intrinsic interspecific competition. Morphological characteristics of the first instar larvae allows them to compete successfully with first instar larvae of *Fopius persulcatus* (Silvestri) and *Fopius arisanus* (Sonan), which are physically eliminated (Palacio et al., 1991; Wang et al., 2008). According to Paranhos et al. (2013), under conditions of intrinsic competition, *D. longicaudata* always wins when competing against native species.

D. crawfordi is predominant in *A. ludens* in citrus and has practically no native competitors (López et al., 1999). This makes its first instar larvae less vulnerable to intrinsic interspecific competition. However, it also makes it an inferior competitor against other species such as the exotic *D. longicaudata*. This has been confirmed in sequential competition experiments with *D. longicaudata*, both as a host's first resident and as a new invader (Miranda et al., 2015).

D. areolatus is predominant in *A. oblique* that infest *Spondias* spp. fruits, where it is also common to find the native species *U. anastrephae* and the exotic *D. longicaudata* (López et al., 1999; Ovruski et al., 2000). The morphological characteristics of *D. areolatus* larvae make this species susceptible to be attacked by *D. longicaudata* and *U. anastrephae*, species with large mandibles. The larvae of *D. longicaudata* and *U. anastrephae* are capable of killing first instar *D. areolatus* larvae (Paranhos et al., 2013; Aluja et al., 2013). In this sense, *D. areolatus* is an inferior intrinsic competitor, and the

release of *D. longicaudata* into the wild potentially could displace *D. areolatus* (Paranhos et al., 2013). However, it has been recently documented that *D. areolatus* attacks very early stages of its host (embryos within the eggs and newly hatched larvae), which may suggest an adaptive advantage in anticipation of other competitors (Murillo et al., 2015). The intrinsic inferiority of *D. areolatus* may be compensated by its early action, which could explain its dominance in the field (Ovruski et al., 2000; López et al., 1999) and, thus, lessen the probability of it being displaced.

U. anastrephae attacks *A. obliqua* larvae in *Spondias* spp. fruits and competes or shares its niche with *D. areolatus* and *D. longicaudata* (López et al., 1999; Ovruski et al., 2000). The larger mandibles of *U. anastrephae* and its higher mobility makes it an intrinsic competitor that is superior to *D. areolatus* (Aluja et al., 2013), with greater resilience in the presence of *D. longicaudata* competition (Paranhos et al., 2013).

O. hirtus is frequently found in rare host species such as *Anastrepha cordata* and *Anastrepha alveata* larvae, which are found in less common fruits (Hernández-Ortiz et al., 1994; López et al., 1999; Sivinski et al., 2000). The occurrence of the host species on less common fruits suggests that the parasitizing species is less subject to intrinsic heterospecific competition (Godfray, 1994), which could explain the morphological characteristics of its first instar larvae that make it an inferior intrinsic competitor that is susceptible to physical attacks by heterospecific larvae.

5. Conclusions

The larval morphological characteristics described here allow a better understanding of the reasons why some parasitoid species are able to succeed under intrinsic competition against other species inside the same host. The large mandibles of *D. longicaudata* and *U. anastrephae* give these species greater advantages for physical combat against competitors in multiparasitism conditions. The long, caudate and vermiform body of *D. areolatus* gives this species increased competitive advantage over *D. crawfordi* and *O. hirtus* in relation to mobility which is used for exploration and escape. The thin and large body of *O. hirtus* makes this species less able to compete with other species.

Acknowledgments

We are grateful to editor R. Alexander Steinbrecht and two anonymous referees for constructive comments and many suggestions for improvement on an earlier version of the ms that helped us write a better paper. We would like to thank Jorge Cancino and Patricia López (MOSCAFRUT Biological Control Laboratory) for their technical assistance and the Moscafrut (SAGARPA-SENASICA) facility for supplying the biological material. This study was funded through Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT Project No. 2011-04-163431. We also thank CONACyT for the doctoral scholarship granted to Félix D. Murillo.

References

- Aluja, M., Guillen, J., Liedo, P., Cabrera, M., Ríos, E., De la Rosa, G., Celedonio, H. and Mota, D., 1990. Fruit infesting Tephritids [Dip.: Tephritidae] and associated parasitoids in Chiapas, Mexico. *Entomophaga*, 35 (1): 39-48.
- Aluja, M., Ovruski, S.M., Sivinski, J., Córdova-García, G., Schliserman, P., Núñez-Campero, S.R. and Ordano, M., 2013. Inter-specific competition and competition-free space in the tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecol Entomol*, 38: 485–496.
- Boivin, G. and Brodeur, J., 2006. Intra-and interspecific interactions among parasitoids: mechanisms, outcomes and biological control. In: Brodeur, J. and Bovin G. (Eds), *Trophic and Guild Interactions in Biological Control*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 123–144.
- Carabajal-Paladino, L.Z., Papeschi, A.G. and Cladera, J.L., 2010. Immature stages of development in the parasitoid wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. *Journal of Insect Science* 10: 56, available online: insectscience.org/10.56.
- Fisher, R., 1961. A study in insect mutiparasitism II. The mechanism and control of competition for possession of the host. *J Exp Biology*, 38: 605-628.
- Godfray, H.C.J., 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, New Jersey.
- Griffiths, N. and Godfray, H.C.J., 1988. Local mate competition, sex ratio and clutch size in bethylid wasps. *Behav Ecol Sociobiol*, 22, 211–217.

- Harvey, J.A., Poelman, E.H. and Tanaka, T., 2013. Intrinsic inter- and intraspecific competition in parasitoid wasps. *Annu Rev Entomol*, 58: 333–51.
- Hagen, K.S., 1964. Developmental stages of parasites. In: Debach, P. (Ed), *Biological control of insects pests and weeds*, London: Chapman and Hall, pp. 186-246.
- Hayat, M.A., 1981. *Fixation for Electron Microscopy*. Academic Press. EUA.
- Llácer, E., Urbaneja, A., Garrido, A. and Jacas, J., 2005. Morphology and development of immature stages of *Galleosomyia fausta* (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). *Ann Entomol Soc Am*, 98: 747–753.
- López, M., Aluja, M. and Sivinski, J., 1999. Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biol Control*, 15: 119–129.
- Mills, N., 2003. Parasitoid interactions and biological control. In: van Driesche, R. (Ed), *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods*, U.S. Dep. Agric., Forest Service, Washington, DC., pp. 108-113.
- Miranda, M., Sivinski, J., Rull, J., Cicero, L. and Aluja, M., 2015. Niche breadth and interspecific competition between *Doryctobracon crawfordi* and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), native and introduced parasitoids of *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) *Biol Control*, 82: 86–95.
- Murillo, F.D., Cabrera-Mireles H., Barrera J.F., Liedo P. and Montoya P., 2015. *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 46: 91-105.
- Onagbola, E.O. and Fadamiro, H., 2008. Morphology and development of *Pteromalus cerealellae* (Ashmead) (Hymenoptera: Pteromalidae) on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae). *BioControl*, 53: 737–750.
- Ovruski, S., Aluja, M., Sivinski, J. and Wharton, R., 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. *Integr Pest Mgmt Rev*, 5: 81–107.
- Paranhos, B.J., Sivinski, J., Stuhl, C., Holler, T. and Aluja, M., 2013. Intrinsic competition and competitor-free-space influence the coexistence of parasitoids

- (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of neotropical Tephritidae (Diptera). *Environ Entomol*, 42: 717-723.
- Pedersen, B.S. and Mills, N.J., 2004. Single vs. multiple introduction in biological control: the roles of parasitoid efficiency, antagonism and niche overlap. *J Appl Ecol*, 41: 973–984.
- Quicke, D.L.J., 1997. *Parasitic Wasps*. Chapman and Hall, London.
- Salt, G., 1961. Competition among insect parasitoids. *Symp Soc Exp Biol*, 15: 96-119.
- SAS Institute, 2008. SAS 9.4 online documentation. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Silver, M.J. and Nappi, A.J., 1986. *In vitro* study of physiological suppression of supernumerary parasites by the endoparasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *J Parasitology*, 72: 405–409.
- Sivinski, J.M., Piñero, J. and Aluja, M., 2000. The distribution of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biol Control*, 18: 258-269.
- Sivinski, J., Aluja, M. and López, M., 1997. 'Spatial and temporal distributions of parasitoids of the Mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees'. *Ann Entomol Soci of Am*, 90: 604-618.
- Tormos, J., Pedro, Ld., Beitia, F., Sabater, B., Asís, J.D. and Polidori, C., 2013. Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in *Aganaspis* parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies. *Microsc Microanal*, 19: 1475–1489.
- Tormos, J., Beitia, F., Böckmann, E.A., Asís, J.D. and Fernández, S., 2009. The preimaginal phases and development of *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera, Pteromalidae) on Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Microsc Microanal*, 15: 422–434.
- Wang, X.G., Bokonon–Ganta, A. and Messing, R., 2008. Intrinsic inter-specific competition in a guild of tephritid fruit fly parasitism: effects of co-evolutionary history on competitive superiority. *Biol Control*, 44: 312-320.
- Wang, X.G. and Messing, R., 2003. Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. *Biol Control*, 27: 251-259.

CAPITULO III

***Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae)**

Félix D. Murillo¹, Héctor Cabrera-Mireles¹, Juan F. Barrera¹, Pablo Liedo¹, Pablo Montoya²

1 El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antigua Aeropuerto Km 2.5, Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico

2 Programa Moscafrut SENASICA-SAGARPA. Camino a los Cacaotales S/N, Metapa de Domínguez, CP 30860, Chiapas, México

Corresponding author: Félix D. Murillo (fmurillo@ecosur.edu.mx)

Abstract

Natural parasitism of *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) on various development stages of *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) attacking *Spondias mombin* L. fruits was studied under field conditions. We collected 120 fruits of *S. mombin* from which we got 495 *A. obliqua* larvae of different instars. A total of 88% of these larvae were parasitized. Within the parasitized cohort, the first-instar of *D. areolatus* was frequently detected in all 3 larval stages (L1 = 94.3%, L2 = 98.1%, and L3 = 100%), and the rest (i.e., L1 = 5.7%, L2 = 1.8%) corresponded to the presence of eggs. In fruits with controlled infestation and cage-induced parasitism under field conditions, *D. areolatus* oviposited in mature eggs and recently hatched larvae of *A. obliqua* with comparable frequencies. Seven preimaginal stages of *D. areolatus* were observed during their development, which was completed in 27 days. It is concluded that *D. areolatus* has the capacity to oviposit in embryo eggs and neonate larvae of *A. obliqua* and that its first-instar larvae (with three distinct sizes) are capable of synchronizing their development with the development of the host larvae. This finding represents the first report of a native parasitoid attacking eggs or neonate larvae of a tephritid in the Neotropics. The implications of this finding are discussed within the context of the competitive interactions of this species with other parasitoid species under sympatric conditions, as well as the relevance for developing laboratory rearing methods for biological control purposes.

Keywords: egg parasitoid, laboratory breeding, interspecific competition, morphology, fruit flies, biological control

Introduction

The native parasitoid guild that attacks fruit flies of the genus *Anastrepha* Schiner in the Neotropics is mainly composed of a group of solitary koinobiont endoparasitoids (primarily Braconidae and Figitidae) that oviposit in the host larvae and emerge from the pupae. The genus *Doryctobracon* constitutes 27% of the parasitoid species and shares a closely related evolutionary history with *Anastrepha* (Lopez et al. 1999, Ovruski et al. 2000).

Another smaller group of *Anastrepha* parasitoids are pupal idiobionts that attack their hosts when they are in the soil and is represented by five species within the genera *Coptera* and *Trichopria* (Diapriidae) and three polyphagous species, *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani), *Spalangia cameroni* Perkins, and *S. endius* Walker (Pteromalidae) (Ovruski et al. 2000). The parasitoid guild of *Anastrepha* spp. in the Neotropics represents an important source of species with potential to be used in biological control programs against native tephritids (Aluja et al. 2003). However, native *Anastrepha* parasitoids attacking eggs or early larval developmental stages have not been reported. The only report of a parasitoid attacking *Anastrepha* eggs in the Americas correspond to Wharton et al. (1981), who found a small level of parasitism of the introduced *Fopius arisanus* (Sonan), apparently on *A. striata* (Schiner) eggs.

According to Aluja et al. (2009) species of the genera *Doryctobracon*, such as *D. crawfordi* (Viereck) and *D. areolatus* (Szepligeti), exhibit great potential as biological control agents and should be examined from the point of view of mass rearing projects. *D. areolatus* has been reported as a solitary koinobiont endoparasitoid that attacks third instar larvae of *Anastrepha* spp., both in native and exotic commercial fruits, with a wide distribution from Florida to Argentina (Hernandez-Ortiz et al. 1994, Lopez et al. 1999, Ovruski et al. 2000, Sivinski, et al. 2000, Aluja et al. 2003, 2009). This species frequently shows field dominance among concurrent parasitoid species attacking *Anastrepha* spp. (Lopez et al. 1999, Sivinski et al. 1997, 2000; Aluja et al. 2003, Ovruski et al. 2004). The presence of diapause (Aluja et al. 1998, Ovruski et al. 2004) and an extrinsic capacity to find patches with low host density (Sivinski et al. 1998) allows an ample distribution in regions with low plant diversity (Eitam et al. 2004).

In the central region of Veracruz, Mexico, *D. areolatus* is the most abundant parasitoid species attacking *Anastrepha obliqua* (Macquart) in *Spondias* spp. (Cabrera et al. 2006), where it has frequently been observed at the beginning of the fruiting season. This suggests that this species could parasitize earlier developmental stages in relation to sympatric parasitoid species. Normally, parasitoids attacking eggs and first instar larvae of their hosts become more competitive than those attacking later stages (Wang and Messing 2002, Wang et al. 2003, Wang et al. 2008, Argov et al. 2011), showing important potential to be used as biocontrol agents. Therefore, our aims in this study were: 1) to determine if *D. areolatus* parasitize immature stages of *A. obliqua* and 2) to characterize its developmental stages during each phase of host development.

Materials and methods

Study area

The study was conducted in the coastal region of central Veracruz, which is characterized by high densities of *A. obliqua* hosts, such as mango (*Mangifera indica* L.), native *Spondias* species and guavas (*Psidium guajava* L.). Fruit samples were collected from trees located in backyard orchards and marginal zones, which provide resources for the presence of flies and parasitoids all year round. This zone is located between 19°00' and 18°55' North latitudes and 96°10' and 96°13' West longitudes, with a mean altitude of 18.5 m.a.s.l. The climate is semi-humid, with a mean annual rainfall of 1,358 mm and a very marked rainy season from June to September. The highest mean monthly temperature (29.1°C) occurs in the month of June and the lowest mean monthly temperature (21.4°C) occurs in the month of January (SMN 2010).

Determination of the natural parasitism of *A. obliqua* larvae by *D. areolatus* under field conditions

From September to October 2013, hog plum (*Spondias mombin* L.) fruits were collected from four sites, three in the locality of “El Copital” and one in “El Mangal”, municipality of

Medellin de Bravo, from four to five trees per site. Fruits were collected directly from the trees (36 fruits, 30%) and from the ground surrounding the trees (84 fruits, 70%). Each sample consisted of 10 fruits per site. Samples were in three sampling dates separated by seven days to cover the fruiting season of *Spondias* spp. A total of 120 fruits were dissected.

Anastrepha obliqua larvae were extracted from each of the fruits the same day they were collected. Larval instars were categorized based on the width of the cephalic capsule and the body length (mean \pm SE) (Carroll and Wharton 1989). Larvae were dissected immediately after collection, and the frequencies of the immature stages of *D. areolatus*, or any other parasitoid species, were recorded following descriptions by Aluja et al. (2013) and Murillo et al. (2016).

Photographs were captured with a Motic Plus 2.0R camera connected to a Carl Zeiss Smz -168R stereomicroscope. The *D. areolatus* immatures inside the *A. obliqua* larvae were measured using Motic Imagen Plus 2.0 R software. The percentage of parasitized larvae was calculated, and frequencies of immature *D. areolatus* stages per larval instar of *A. obliqua* were determined.

Induction of *D. areolatus* parasitism on *A. obliqua* eggs and recently hatched larvae

Wild *A. obliqua* flies were collected as larvae from infested *S. mombin* fruits in the field. Upon completion of their development, the larvae were placed in containers with sterile sand for pupation. They were maintained under these conditions until adult emergence. Adults were maintained with water and food (sugar plus hydrolyzed yeast in a 3:1 ratio) until they were sexually mature.

Hog plum (*S. mombin*) fruits were previously protected from natural infestation by bagging clusters of young fruits using 30 x 20 cm brown paper bags. A total of 30 bags (\approx 10 fruits/bag) were used to protect \approx 300 fruits. The fruits were subsequently collected, taking their maturity into account to allow for experimental infestation.

Infestation on the previously protected fruits was induced by exposing the fruits to *A. obliqua* gravid females (8–10 days old) in Plexiglass cages (20x20x20 cm) placed on

a table in the field. Two clusters with five to eight fruits were placed in each cage together with 10 female flies and remained in the field at a mean temperature of 28.2°C (range: 23.2–36.1) and a mean RH of 81.6% (range: 55.1–95.3). Flies were maintained for six hours in each cage and dead flies were replaced.

Anastrepha obliqua eggs were exposed to the parasitoid in the same type of cages 24, 48, and 72 hours after fly oviposition in the fruit (\approx egg age), in order to cover the different egg stages before larval hatching. Twenty 7-day-old *D. areolatus* females were placed in each cage for three hours, time enough to locate and oviposit in the exposed eggs. Immediately after exposure, 35 *A. obliqua* eggs and 15 newly hatched larvae were extracted from the fruits. The eggs were characterized as either yolk-egg or embryo-egg (after Chapman 2013, pp: 358–407). All of the *A. obliqua* individuals in the egg and larval stages were dissected to characterize and record the immature stages of *D. areolatus*.

Characterization of *D. areolatus* development and morphological changes

Development of *D. areolatus* eggs and larvae was individually photographed and measured. To follow the development of *D. areolatus* in *A. obliqua* pupae, mature *A. obliqua* larvae were obtained from presumably infested fruit collected in the field. These larvae were placed in 100-ml plastic containers with sterile sand as a substrate to facilitate pupation. Three cohorts of 50 *A. obliqua* pupae were examined, and 3 to 5 pupae per day were dissected from 0 to 12 days of growth. *D. areolatus* individuals and their developmental stages were recorded for each *A. obliqua* pupa.

The frequencies of the different immature developmental stages and the characteristics of *D. areolatus* were calculated for each immature stage of *A. obliqua*. All of the observations of the organisms were conducted using the above-mentioned microscope.

Data analysis

Chi-square test was used to compare the number of *D. areolatus* individuals observed at each developmental stage with the expected number, using SPSS Statistic 17.0. (SPSS Inc., 2008). Measurements of the cephalic capsules of *A. obliqua* larvae are given as the mean \pm (SE). The proportions of the immature stages of *D. areolatus* for each *A. obliqua* egg and larval stages are presented as observed numbers, and *D. areolatus* development is presented as numbers of individuals and percentages.

Results

Natural parasitism in the field

From the 120 fruits that were sampled, 495 *A. obliqua* larvae were extracted; 85, 115 and 295 of these were L₁, L₂ and L₃ larvae, respectively, and 69 (82%), 104 (90%) and 264 (89%) of these larval stages were parasitized, respectively (mean parasitism = $88 \pm 5.2\%$).

D. areolatus was the dominant parasitoid species (93.1%), and only *Utetes anastrephae* (Viereck) (5.4%) was found as the second most dominant parasitoid (Figure 1a). The remaining 1.5% (third-instar larvae) was parasitized by both species and no apparent advantage was observed for either species, except for the occasional larger size of *D. areolatus* larvae (Figure 1b). *D. areolatus* and *U. anastrephae* larvae found together were first-instar larvae, which were easily distinguishable from each other, primarily because of the larger sizes of the cephalic capsule and the jaws of *U. anastrephae* (see Fig. 1).

The mean \pm (SE) of the widths of the cephalic capsules and the body lengths, respectively, of *A. obliqua* larval instars were 0.09 ± 0.001 mm and 0.90 ± 0.05 mm for the L₁, 0.37 ± 0.03 mm and 4.67 ± 0.3 mm for the L₂, and 0.63 ± 0.004 mm and 9.16 ± 0.3 mm for the L₃.

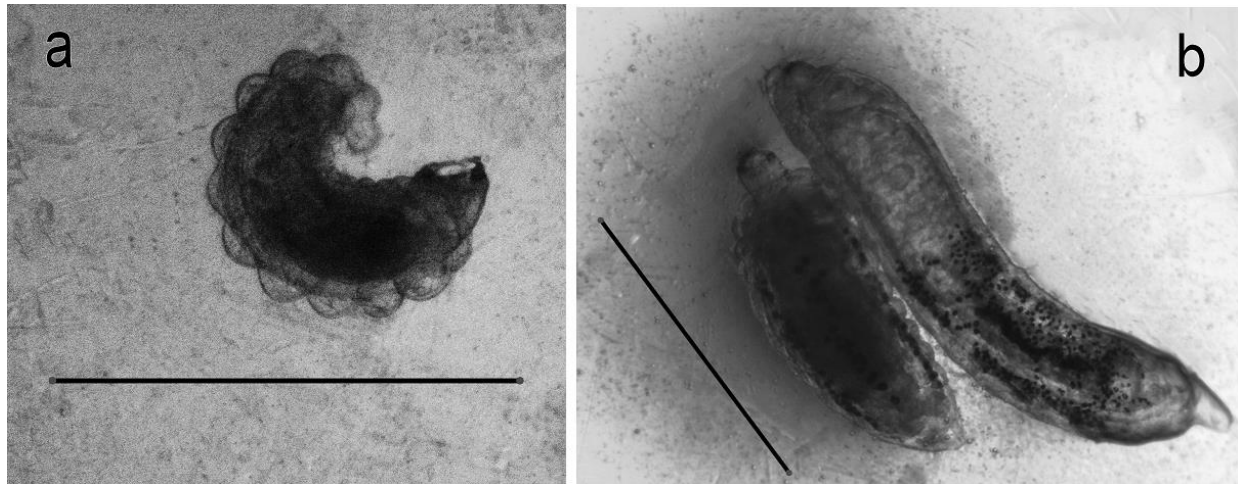


Figure 1. Parasitoids found in naturally parasitized *A. obliqua* larvae. **a** First instar larva of *U. anastrephae* found in a third instar larva of *A. obliqua* and **b** Larvae of *U. anastrephae* and *D. areolatus* found together in a third instar larva of *A. obliqua*. Bar = 1 mm.

Table 1. Numbers of observed individual stages of development of *D. areolatus* recorded in the different larval stages of *A. obliqua* extracted from field-collected hog plums (*S. mombin*).

<i>D. areolatus</i>	<i>A. obliqua</i>		
	L1	L2	L3
Egg	3	2	0
L ₁ Early	66	5	0
L ₁ Intermediate	0	97	2
L ₁ Late	0	0	262

L1 Early = First instar larva small (≈ 0.8 mm long); L1 Intermediate = First instar larva medium (≈ 1.4 mm long); L1 Late = First instar larva large (≈ 1.7 mm long).

The numbers of the developmental stages of *D. areolatus* recorded in the various stages of naturally parasitized *A. obliqua* are given in Table 1. Embryo-eggs and a high frequency of early first-instar larvae were detected in *A. obliqua* first-instar larvae. In second-instar larvae, the presence of *D. areolatus* eggs was minimal, with a higher frequency of intermediate first-instar larvae. In the third-instar larvae, nearly all of the *D. areolatus* were late first-instar larvae. The relationship between the immature stages of *D. areolatus* and the larval states of *A. obliqua* was significant ($\chi^2_{4} = 800.9$, $P < 0.0001$).

Presence of *D. areolatus* eggs in recently hatched *A. obliqua* larvae

In the controlled infestation experiment, *A. obliqua* yolk-eggs were not parasitized, which indicates that *D. areolatus* did not parasitize eggs without a formed embryo (Table 2). However, parasitism was detected in *A. obliqua* embryo-eggs. A recently laid *D. areolatus* egg (with yolk in its interior) on an *A. obliqua* embryo can be observed in Figure 2 and is folded in the embryo's interior, given that both structures are of a similar length. Seven recently hatched *A. obliqua* larvae that were parasitized by *D. areolatus* eggs were dissected; five were still in the yolk stage and two in the embryo stage (Figure 3a).

Table 2. Numbers of *D. areolatus* developmental stages found in *A. obliqua* eggs and first instar larvae when *S. mombin* fruits were infested in a controlled manner.

<i>D. areolatus</i>	<i>A. obliqua</i>			
	Eggs		First instar larvae	
	Yolk	Embryo	Newly emerged	Mature
Egg (yolk)	0	3	5	0
Egg (embryo)	0	0	2	2
L ₁ Early	0	0	0	13

L1 Early = First instar larva small (\approx 0.8 mm long).

Superparasitism by *D. areolatus* was recorded in two out of seven recently hatched *A. obliqua* larvae, and six parasitoid eggs were recorded from one larva (Figure 3b).

Fifteen mature first-instar *A. obliqua* larvae were dissected. Of these, 13 were parasitized with early first-instar larvae and 2 with embryo-eggs of *D. areolatus*. Yolk eggs of *D. areolatus* were not found (Table 2). The relationship between the immature stages of *D. areolatus* and the immature stages of *A. obliqua* was significant ($\chi^2_4 = 22.4$, $P < 0.0001$).

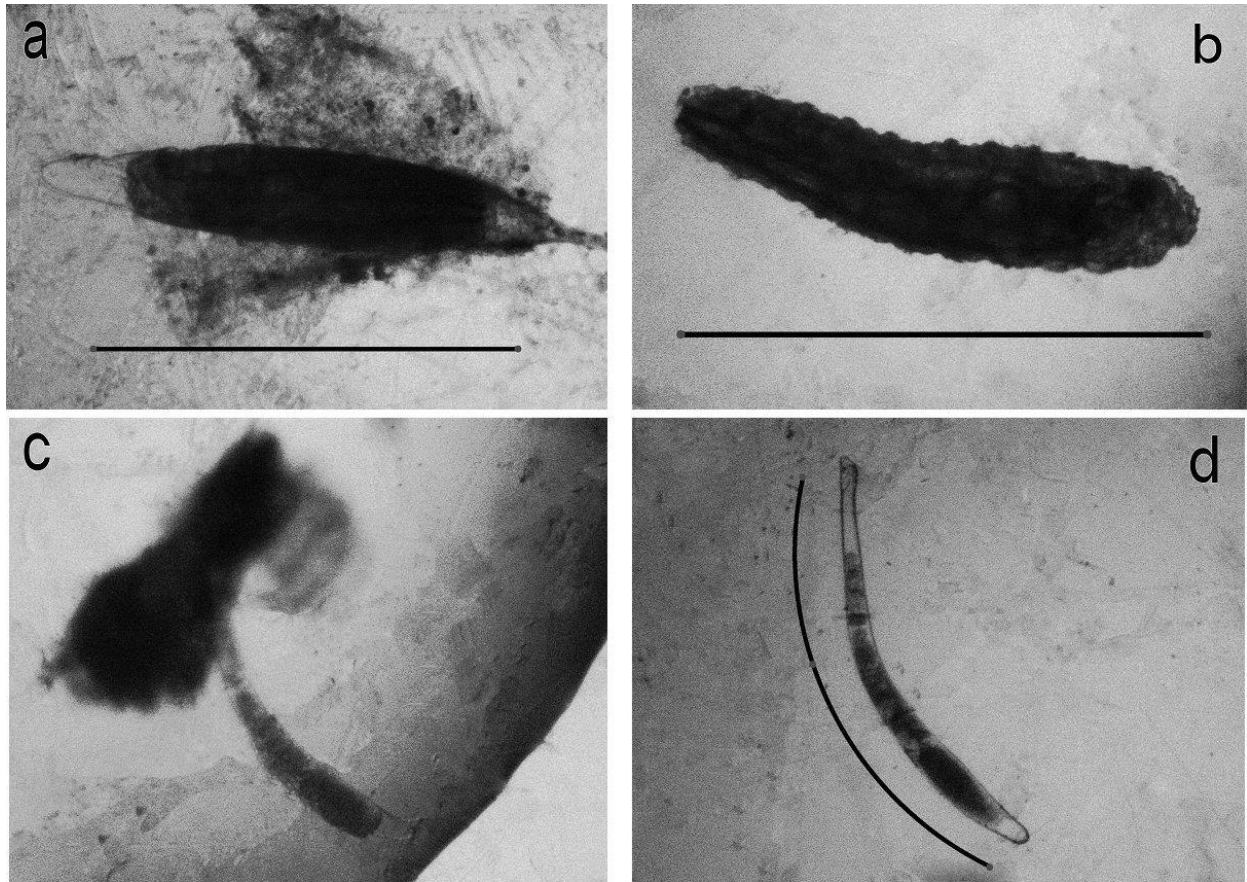


Figure 2. *D. areolatus* parasitizing an *A. obliqua* embryo. **a** *A. obliqua* egg embryo **b** *A. obliqua* embryonic egg removed **c** *D. areolatus* egg extracted from *A. obliqua* embryo, and **d** *D. areolatus* egg. Bar = 1 mm.

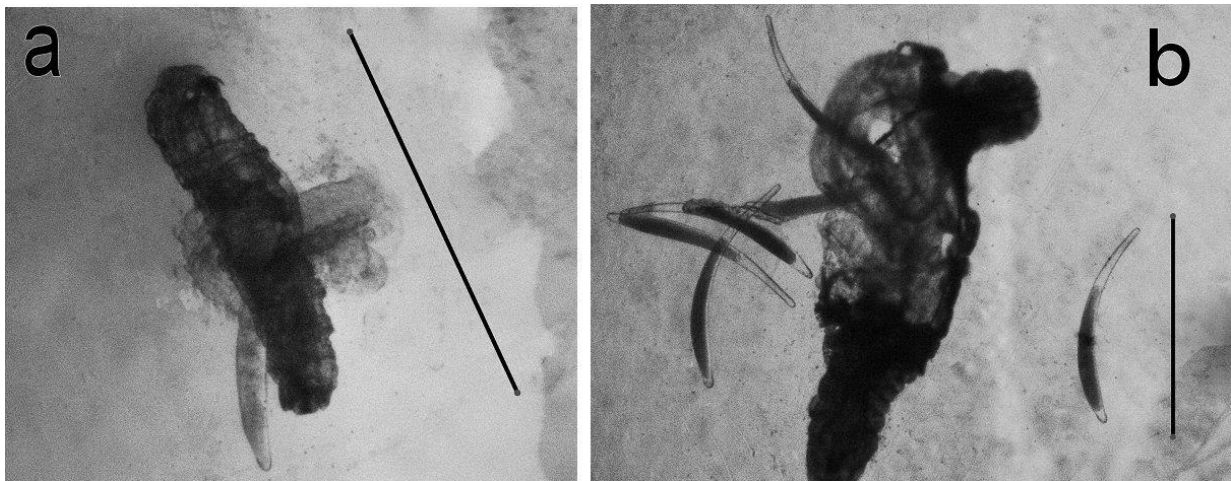


Figure 3. Parasitized *A. obliqua* newly hatched larvae **a** with a *D. areolatus* egg inside and **b** with six eggs of *D. areolatus* inside. Bar = 1 mm.

Characterization of *D. areolatus* development

The *D. areolatus* egg measures ≈ 1 mm long and has an elongated shape and a whitish color with a dark yolk. After 24 hours, the embryo is formed with a claviform appearance and measures ≈ 0.5 mm in length (Table 3 and Figure 4).

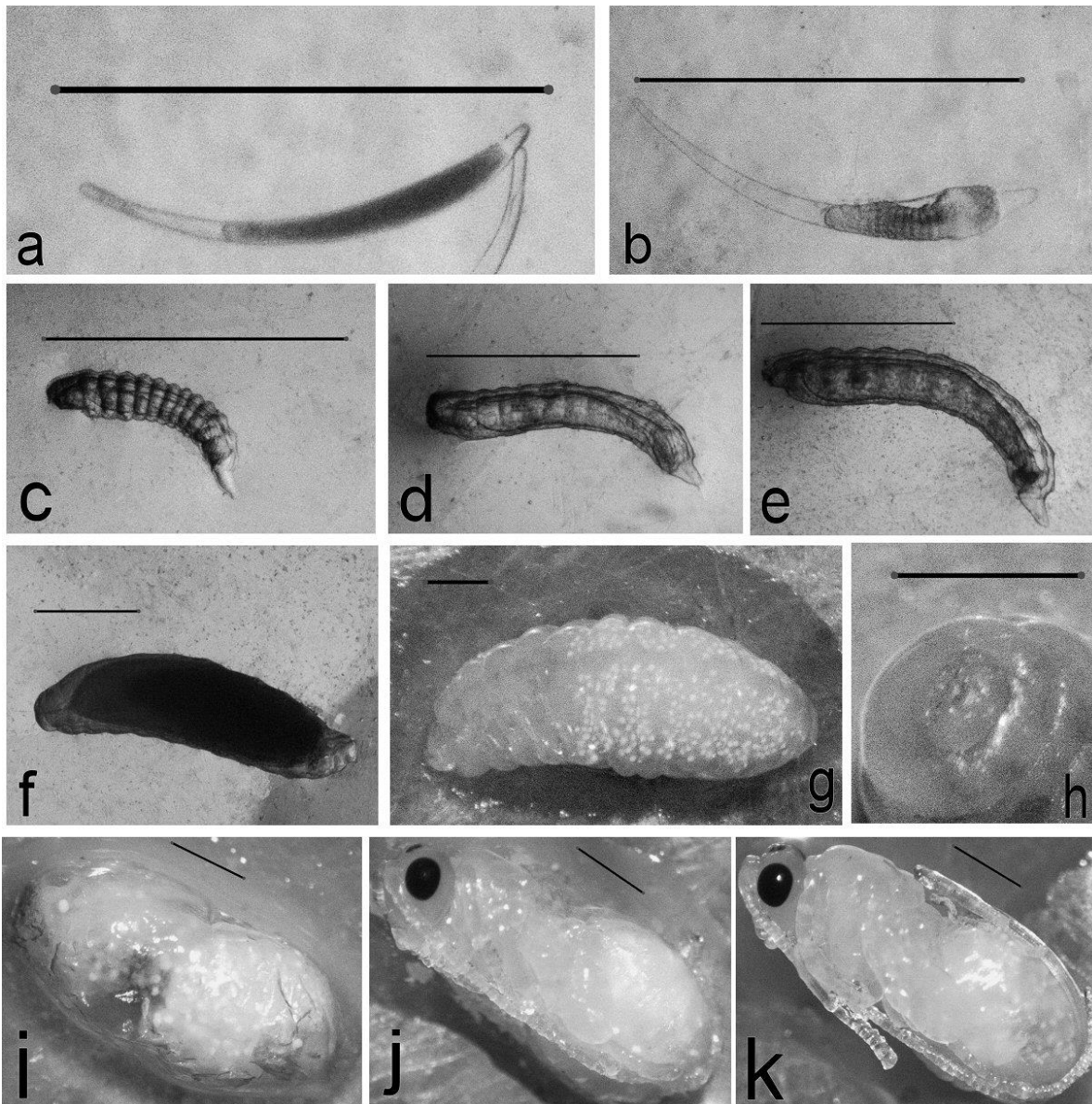


Figure 4. Development of immature stages of *D. areolatus*. **a** egg yolk **b** egg embryo **c** early first instar larva **d** intermediate first instar larva **e** late first instar larva **f** second instar larva **g** third instar larva **h** jaw of third instar larva **i** prepupa **j** male pupa, and **k** female pupa with her ovipositor. Bar = 1 mm.

Table 3. Numbers (and percentages) of individuals of each developmental stage of *D. areolatus* during the various developmental stages of *A. obliqua* in *S. mombin*.

<i>D. areolatus</i>	<i>A. obliqua</i>																		n (state Biological)	
	Egg		Larva			Pupa														
	Yolk	Embryo	L ₁	L ₂	L ₃	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		13
Egg	0 (0)	3 (60)	2 (40)																	5
Embryo			5 (100)																	5
L ₁ Early			66 (93)	5 (7)																71
L ₁ Intermediate				97 (98)	2 (2)															99
L ₁ Late					262 (84)	5 (16)														267
L ₂						1 (5)	10 (45)	6 (27)	5 (23)											22
L ₃										8 (57)	6 (43)									14
Prepupa												10 (48)	8 (38)	3 (14)						21
Pupa														17 (47)	8 (22)	7 (19)	4 (11)			36
Pharate adult																		5 (23)	17 (77)	22
Total 562																				

L₁ Early = First instar larva small (\approx 0.8 mm long), L₁ Intermediate = First instar larva medium (\approx 1.4 mm long) and L₁ Late= First instar larva large (\approx 1.7 mm long).

The embryo of *D. areolatus* becomes an early first-instar larva within 24 to 36 hours of oviposition and measures ≈ 0.8 mm in length. After three to four days, an early first instar larva grows into an intermediate first-instar larva, with a length of ≈ 1.4 mm. After another three to four days, the larva grows into a late first-instar larva measuring ≈ 1.7 mm in length. This larva almost immediately changes to a second-instar once the host pupa has formed, increasing in size and changing its shape (Table 3 and Figure 4).

In recently formed *A. obliqua* pupae, a higher frequency of late first-instar larvae of *D. areolatus* in the process of transformation to the second instar stage were observed. In 1-day old pupae, the *D. areolatus* larva had changed completely to the second instar stage, measuring ≈ 3.5 mm long, losing the cephalic capsule and occupying more than a third of the host pupa. In 3-to-4-day old pupae, the larva develops into the third instar stage, measuring ≈ 6.0 mm long, changing body shape, and occupying all of the host pupa. In 6 day-old *A. obliqua* pupae, *D. areolatus* prepupae that exhibit eye development have formed. In 8-day old host pupae, the parasitoid pupae are already observed with well-defined structures and genitalia. In 12-day old and older *A. obliqua* pupae, the parasitoids are found as their complete adult structure (Table 3 and Figure 4).

Discussion

The presence of eggs and larvae of *D. areolatus* in the interior of eggs and recently hatched *A. obliqua* larvae represent a novel finding within the native parasitoid guild that attack fruit flies in the Neotropics, because there have been no previous reports of any native parasitoid covering this ecological niche (Lopez et al. 1999, Ovruski et al. 2000).

Among the particular observations regarding this finding under forced conditions, it was notable that *D. areolatus* oviposit inside embryo-eggs of *A. obliqua*, depositing a flexible egg that can fold inside the interior of the host embryo, and that the first-instar larvae present a prolonged development with three distinct sizes that synchronize with the development of the host larva and pupa. The low number of embryo-eggs found with egg parasitoids could be explained by the short developmental time of eggs (less than 24 hours).

In Mexico, *D. areolatus* has been reported to be closely associated with *A. obliqua* in fruit hosts of the genus *Spondias* (Lopez et al. 1999, Ovruski et al. 2000, Sivinski et al. 2000), which most likely is favored by the presence of semiochemicals that could allow it to attack early stages of *A. obliqua* (eggs and recently hatched larvae). This scenario seems similar to that of *F. arisanus*, which detects marking pheromones and kairomones that emanate from the eggs of its host or from the interaction of the fruit and the host egg (Rousse et al. 2005, 2007, Perez et al. 2013).

The finding of the parasitism of *D. areolatus* on eggs and recently hatched larvae of *A. obliqua* sheds light on two relevant aspects of its role as a natural enemy and biological control agent of fruit flies: 1) its competition and coexistence with other opiine parasitoids, highlighting the exotic species *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) and the native species *U. anastrephae* (Garcia-Medel et al. 2007, Sivinski et al. 1998, Paranhos et al. 2013, Aluja et al. 2013), and 2) the promising development of its mass rearing under laboratory conditions (Eitam et al. 2003, Aluja et al. 2009).

It has been argued that *D. areolatus* is an inferior competitor compared to *D. longicaudata* (Sivinski et al. 1998, Eitam et al. 2004) and to *U. anastrephae* (Aluja et al. 2013). It has also been suggested that *D. longicaudata*, given its larger ovipositor, could cause a local extinction by displacing *D. areolatus* when deprived of free space left by its competitors, as it has been suggested to explain the reduction of the dispersion range in Florida, USA, in the presence of *D. longicaudata* (Sivinski et al. 1998). For *U. anastrephae*, it has been suggested that the historic sympatry of *D. areolatus* and *U. anastrephae* depends on the ability of *D. areolatus* to avoid competition with the intrinsically superior competitor by exploiting hosts in larger fruits that are out of the reach of the smaller ovipositor of *U. anastrephae* (Sivinski et al. 1997, Aluja et al. 2013). However, our new findings suggest that both hypotheses can be reformulated in relation to the biology and oviposition behavior of *D. areolatus*.

An early action of *D. areolatus* against immature *A. obliqua* could represent an ecological advantage that prevents its displacement or local extinction by other competitors such as *U. anastrephae* and *D. longicaudata*, since these latter species invariably will attack mature larval stages that could already be parasitized by *D. areolatus*. According to Wang et al. (2003, 2008), in *F. arisanus* this earlier attack

increases the probability to suppress the invasive larva through starvation or suffocation mechanisms. Field observations seem to support this assertion. Even though *D. longicaudata* has become established in numerous sites in Mexico where it has been released, its presence in *Spondias* species is inferior to that of *D. areolatus* (Lopez et al. 1999, Sivinski et al. 2000, Montoya et al. unpublished data). Our data showed that this species also competes successfully against *U. anastrephae* by parasitizing eggs and recently hatched larvae, which enables *D. areolatus* to become the dominant parasitoid species in these hosts. Laboratory studies have reported that *D. areolatus* is an inferior competitor relative to *D. longicaudata* and *U. anastrephae* (Paranhos et al. 2013, Aluja et al. 2013) because larvae of *D. longicaudata* and *U. anastrephae* kill larvae of *D. areolatus* during competition through sequential exposures. However, these studies were conducted using mature host larvae (3rd instar), which, according to our results, presents a disadvantage to *D. areolatus*.

One difficulty in rearing *D. areolatus* has apparently been the oviposition stimuli in oviposition units (artificial devices with third-instar host larvae mixed with food) (Eitam et al. 2003), which has not been a problem in the case of *D. longicaudata* because this species detects its host by larval vibrations when feeding or moving (Lawrence 1981). However, in light of our new findings, new perspectives on laboratory rearing of this species are realized. The use of late-stage eggs or neonate larvae, similar to *Fopius arisanus* rearing (Harris et al. 1991, Zenil et al. 2004, Rouse et al. 2005, Montoya et al. 2009), should be tested.

Unsuccessful attempts have been made to rear *D. areolatus* using fruits with third instar host larvae (Eitam et al. 2003). This could be because *D. areolatus* females need different stimuli, such as chemical signals emitted by host (eggs or young larvae) interacting with fruit volatiles, as has been demonstrated for *F. arisanus* (Rouse et al. 2007, Perez et al. 2013).

The preimaginal development of *D. areolatus* in *A. obliqua* required approximately 27 days, and 7 preimaginal stages were classified: egg, three larval stages, prepupa, pupa, and pharate adult. The morphological observations of the preimaginal stages of *D. areolatus* are in agreement with what has been reported for *F. arisanus* and *D. longicaudata* (Rouse et al. 2005, Carabajal-Paladino et al. 2010). However, the

development of *D. areolatus* is more akin to *F. arisanus* because both exhibit a facultative synchronization between their larval development and that of its host, which is reflected in the long period of time for the first-instar larva, which finally changes when its host reaches the prepupal stage (Rousse et al. 2005). This type of development allows the second or third instars of *F. arisanus* (and probably *D. areolatus*) to occupy most of the available space inside the pupa, which facilitate the elimination of competing larvae (Wang et al. 2003, 2008).

Our study shows that *D. areolatus* can parasitize *A. obliqua* eggs and recently hatched larvae, giving an advantage over other parasitoids that attack the later-stage larvae. This finding represents a novel report regarding the oviposition behavior of this species, suggesting that it may occupy an ecological niche that was previously thought empty in the Americas. These findings also open new perspectives for the biological control of fruit flies. If mass rearing methods are developed, this will allow release of the most dominant fruit fly parasitoid species in the Neotropics.

Acknowledgements

We thankfully acknowledge Ana Lilia Montero (ECOSUR), Gerardo de Jesus Alonso, and Guillermo Jaime (ITUG) for their assistance in fieldwork and Maria Guadalupe Nieto (ECOSUR) for her assistance in laboratory. This study was funded by the SAGARPA CONACYT Sectorial Fund project 163431, and it was part of Felix D. Murillo Ph. D. thesis at ECOSUR with a fellowship from CONACYT.

References

- Aluja M, Lopez M, Sivinski J (1998) Ecological evidence for diapause in four native and one exotic species of larval-pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids in tropical environments. *Annals of the Entomological Society of America* 91: 821–833. doi: 10.1093/aesa/91.6.821
- Aluja M, Rull J, Sivinski J, Norrbom AL, Wharton RA, Macias-Ordóñez R, Diaz-Fleischer F, Lopez M (2003) Fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) and

- associated native parasitoids (Hymenoptera) in the tropical rainforest biosphere reserve of Montes Azules, Chiapas, Mexico. *Environmental Entomology* 32: 1377–1385. doi: 10.1603/0046-225X-32.6.1377
- Aluja M, Sivinski J, Ovruski S, Guillen L, López M, Cancino J, Torres-Anaya A, Gallegos-Chan G, Ruiz L (2009) Colonization and domestication of seven species of native New World hymenopterous larval-preupal and pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. *Biocontrol Science and Technology* 19: 49–79. doi: 10.1080/09583150802377373
- Aluja M, Ovruski SM, Sivinski J, Córdova-García G, Schliserman P, Nuñez-Campero SR, Ordano M (2013) Inter-specific competition and competition-free space in the tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecological Entomology* 38: 485–496. doi: 10.1111/een.12039
- Argov Y, Blanchet A, Gazit Y (2011) Biological control of the Mediterranean fruit fly in Israel: Biological parameters of imported parasitoid wasps. *Biological Control* 59: 209–214. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.07.009
- Cabrera MH, Murillo CFD, Ortega ZDA (2006) Dinámica del parasitismo larva-pupa en *A. obliqua* en frutales hospederos en la región central costera de Veracruz. [Dynamics of the larva-pupa parasitism in *A. obliqua* in fruit hosts in the coastal region of central Veracruz] *Proceedings of the XXIX National Congress of Biological Control*. Manzanillo, Colima. 171–175.
- Carabajal-Paladino LZ, Papeschi AG, Cladera JL (2010) Immature stages of development in the parasitoid wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. *Journal of Insect Science* 10: 56. doi: 10.1673/031.010.5601
- Carroll L, Wharton RA (1989) Morphology of the Immature Stages of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 82(2): 201–214. doi: 10.1093/aesa/82.2.201
- Chapman RF (2013) *The Insects: Structure and Function*. (5th edition), Simpson SJ and Douglas AE (Eds) Cambridge University Press: 358–407.
- Eitam A, Holler T, Sivinski J, Aluja M (2003) Use of host fruit chemical cues for laboratory rearing of *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae), a

- parasitoid of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). Florida Entomologist 86: 211–216. doi: 10.1653/0015-4040(2003)086[0211:UOHFCC]2.0.CO;2
- Eitam A, Sivinski J, Holler T, Aluja M (2004) Biogeography of braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Florida. Annals of the Entomological Society of America 97: 928–939. doi: 10.1603/0013-8746(2004)097[0928:BOBPOT]2.0.CO;2
- Garcia-Medel D, Sivinski J, Diaz-Fleischer F, Ramirez-Romero R, Aluja M (2007) Foraging behavior by six fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) released as single- or multiple-species cohorts in field cages: Influence of fruit location and host density. Biological Control 43: 12–22. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.06.008
- Harris EJ, Okamoto RY (1991) A method for rearing *Biosteres arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) in the laboratory. Journal of Economic Entomology 84: 417–422. doi: 10.1093/jee/84.2.417
- Hernandez-Ortiz V, Perez-Alonso R, Wharton R (1994) Native parasitoids associated with the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. Entomophaga 39:171–178. doi: 10.1007/BF02372355
- Lawrence PO (1981) Host vibration- a cue to host location by the parasite, *Biosteres longicaudatus*. Oecologia 48: 249–251. doi: 10.1007/BF00347971
- Lopez M, Aluja M, Sivinski J (1999) Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. Biological Control 15: 119–129. doi: 10.1006/bcon.1999.0711
- Montoya P, Suarez A, Lopez F, Cancino J (2009) *Fopius arisanus* oviposition in four *Anastrepha* fruit fly species of economic importance in Mexico. BioControl 54:437–444. doi: 10.1007/s10526-008-9193-6
- Murillo FD, Liedo P, Nieto-López MG, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Montoya P (2016) First instar larvae morphology of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) fruit flies. Implications for interspecific competition. Arthropod Structure & Development. doi:10.1016/j.asd.2016.01.003
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R (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. *Integrated Pest Management Reviews* 5: 81–107. doi: 10.1023/A:1009652431251
- Ovruski S, Schliserman P, Aluja M (2004) Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in northwestern Argentina. *Biological Control* 29: 43–57. doi: 10.1016/S1049-9644(03)00127-0
- Paranhos BJ, Sivinski J, Stuhl C, Holler T, Aluja M (2013) Intrinsic competition and competitor free-space influence the coexistence of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of neotropical Tephritidae (Diptera). *Environmental Entomology* 42: 717–723. doi: 10.1603/EN12282
- Pérez J, Rojas JC, Montoya P, Liedo P, Castillo A (2013) *Anastrepha* egg deposition induces volátiles in fruits that attract the parasitoid *Fopius arisanus*. *Bulletin of Entomological Research* 103: 318–325. doi: 10.1017/S0007485312000739
- Rousse P, Harris EJ, Quilici S (2005) *Fopius arisanus*, an egg–pupal parasitoid of Tephritidae. Overview. *Biocontrol News and Information* 26(2): 59–69.
- Rousse P, Chiroleu F, Veslot J, Quilici S (2007) The host and microhabitat olfactory location by *Fopius arisanus* suggests a broad potential host range. *Physiological Entomology* 32: 313–321. doi: 10.1111/j.1365-3032.2007.00575.x
- Sivinski J, Aluja M, Lopez M (1997) Spatial and temporal distributions of parasitoids of the Mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 604–618. doi: 10.1093/aesa/90.5.604
- Sivinski J, Aluja M, Holler T, Eitam A (1998) 'Phenological comparison of two braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae)'. *Environmental Entomology* 27: 360–365. doi: 10.1093/ee/27.2.360
- Sivinski JM, Pinero J, Aluja M (2000) The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control* 18: 258–269. doi: 10.1006/bcon.2000.0836
- SMN (2010) National Meteorological Service (Servicio Meteorológico Nacional). Normal values (1971-2000) for Medellín de Bravo, Veracruz (Valores normales de 1971-

2000 para Medellín de Bravo, Veracruz). Available: <http://smn.cna.gob.mx/> [Accessed 22 October 2013].

- SPSS Inc. (2008) SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.
- Wang XG, Messing RH (2002) Newly imported larval parasitoids pose minor competitive risk to the extant egg-larval parasitoid of fruit flies in Hawaii. *Bulletin of Entomological Research* 92: 423–429. doi: 10.1079/BER2002181
- Wang XG, Messing RH, Bautista RC (2003) Competitive superiority of early acting species: a case study of opiine fruit fly parasitoids. *Biocontrol Science and Technology* 16: 391–402. doi: 10.1080/0958315031000104514
- Wang XG, Bokonon-Ganta AH, Messing RH (2008) Intrinsic inter-specific competition in a guild of tephritid fruit fly parasitoids: Effect of co-evolutionary history on competitive superiority. *Biological Control* 44: 312–320. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.10.012
- Wharton RA, Gilstrap FE, Rhode RH, Fischel-M M, Hart WG (1981) Hymenopterous egg pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Dip.: Tephritidae) in Costa Rica. *Entomophaga* 26: 285–290. doi: 10.1007/BF02371878

CAPITULO IV

Competencia intrínseca entre parasitoides residentes e invasores que atacan a la mosca de la fruta de las Indias Occidentales *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae)

Félix D. Murillo^a, Héctor Cabrera-Mireles^a, Juan F. Barrera^a, Pablo Liedo^a y Pablo Montoya^b

^a El Colegio de la Frontera Sur. Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5. Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico.

^b Programa Moscafrut, SENASICA-SAGARPA. Camino a los Cacaotales S/N, Metapa de Domínguez, CP 30860, Chiapas, México.

Corresponding author: Félix D. Murillo (El Colegio de la Frontera Sur. Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5. Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico. Phone +52 (962) 628 9800, ext.5604. fmurillo@ecosur.edu.mx).

Resumen

El estudio tuvo como objetivo evaluar la competencia intrínseca entre *Diachasmimorpha longicaudata* como invasor y *Doryctobracon areolatus* y *Utetes anastrephae* como residentes, así como la competencia intrínseca entre *U. anastrephae* como invasor y *D. areolatus* como residente. El porcentaje de larvas vivas de *D. areolatus* disminuyó un 39.8 y 29.4% cuando compitió con los invasores *D. longicaudata* y *U. anastrephae*, respectivamente, sin que estos se vieran afectados por la presencia de *D. areolatus* como residente. El porcentaje de parasitismo de *D. areolatus* disminuyó 31.5 y 60.8% cuando compitió con los invasores *D. longicaudata* y *U. anastrephae*, respectivamente. El parasitismo de *D. longicaudata* disminuyó 44.6 y 41.6% en presencia de los residentes *D. areolatus* y *U. anastrephae* respectivamente, y el parasitismo de *U. anastrephae* solo fue afectado cuando fue residente. Se concluye que *D. areolatus* es un competidor intrínseco inferior y que es posible que *D. longicaudata* discrimine hospederos previamente parasitados por *D. areolatus*, lo que compensa esta inferioridad intrínseca de *D. areolatus* y ratifica que las liberaciones de *D. longicaudata* no afectarán a *D. areolatus*. *U. anastrephae* resistió la presencia competitiva de *D. longicaudata*, lo cual sugiere que podría ser utilizado como agente de control biológico complementario contra *A. obliqua* en frutos del género *Spondias*.

Palabras claves: *Diachasmimorpha longicaudata*, *Doryctobracon areolatus*, *Utetes anastrephae*, *Spondias* spp., competitividad

1. Introducción

La mosca de la fruta de las Indias Occidentales, *Anastrepha obliqua* (Macquart), ha sido reportada desde el sur de EE.UU. (Florida y Texas) hasta el norte de Argentina, incluyendo las islas Caribeñas, donde causa serios daños a varios frutales de importancia económica, como el mango, guayaba y ciruela mexicana (Hernández-Ortíz y Aluja 1993). En México *A. obliqua* es una plaga importante para el cultivo del mango, pero infesta con mayor severidad a las especies nativas de Anacardiaceae, como las ciruelas mexicanas del género *Spondias* (Hernández-Ortíz y Aluja 1993). La ciruela jobo (*Spondias mombin*) y cundoria (*S. dioica*), son hospederos especialmente atractivos para esta mosca, donde sus larvas son atacadas por los parasitoides Braconidos Opiinae *Doryctobracon areolatus* (Szepliget), *Utetes anastrephae* (Viereck) y *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (López et al. 1999; Sivinski et al. 2000).

Doryctobracon areolatus y *U. anastrephae* son dos especies nativas, que coexisten en la región Neotropical en países como México, Brazil y Republica Dominicana (López et al. 1999; Garcia y Corseuil 2004; Serra et al. 2011). Se ha planteado que esta coexistencia depende de la habilidad de *D. areolatus* para escapar de *U. anastrephae* a través de la explotación de hospederos en frutos más grandes que están fuera del alcance del ovipositor pequeño de *U. anastrephae* (Sivinski et al. 1997; Aluja et al. 2013). *D. longicaudata* es una especie exótica ampliamente utilizada en diversas partes del mundo como un agente de control biológico (Sivinski et al. 1996; Montoya et al. 2000), y se ha postulado que debido a que posee un ovipositor de mayor tamaño que *U. anastrephae*, podría ocasionar una extinción local por desplazamiento de *D. areolatus* al privarlo de los espacios libres que deja su competidor *U. anastrephae* (Sivinski et al. 1998; Eitam et al. 2004), como se ha sugerido para explicar la reducción del rango de dispersión de *D. areolatus* en el estado de Florida, USA (Sivinski et al. 1998). Sin embargo, información reciente señala que *D. areolatus* tiene una acción sobre los estados inmaduros tempranos como huevos y larvas neonatas de *A. obliqua*, y que el desarrollo de su larva L1 abarca todo el periodo de desarrollo de la larva hospedera (Murillo et al. 2015), lo cual puede brindar una ventaja competitiva contra *D. longicaudata* y *U. anastrephae*, ya que estas especies invariablemente atacarán estadios larvales maduros que tendrían una alta probabilidad de haber sido parasitados

por *D. areolatus*, como se reporta en especies de acción temprana como *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae) (Wang et al. 2003; Bokonon-Ganta et al. 2005; Kroder y Messing 2010).

En competencia intrínseca (competencia en el interior del hospedero), Aluja et al. (2013) reportan que *U. anastrephae* es típicamente victorioso sobre *D. areolatus* si las dos oviposiciones ocurren dentro de las 24 horas sobre larvas maduras del hospedero en condiciones de laboratorio, pero que la competencia entre *U. anastrephae* y *D. longicaudata* es más similar (Paranhos et al. 2013). También se ha reportado que *D. longicaudata* es un competidor intrínseco capaz de suprimir el desarrollo de *D. areolatus* (Paranhos et al. 2013) y eliminar a los parasitoides de huevo *Fopius arisanus* (Sonan) y *F. persulcatus* (Silvestri), cuando la competencia física toma lugar como larvas de primer instar de los parasitoides (Palacio et al. 1991, Wang et al. 2008).

Es posible que las interacciones competitivas interespecíficas que se presentan entre los parasitoides puedan afectar más a las especies nativas que al exótico que ha sido introducido recientemente, principalmente cuando tienen similitudes morfológicas y carecen de una historia evolutiva simpátrica (Miranda et al. 2015), además el poco tiempo de introducción no ayuda a que se formen oportunidades de selección que generen divergencia de nicho o produzcan respuestas facultativas a la competencia (Sivinski et al. 1997, 1998; Pedersen y Mills 2004).

Por lo tanto, comprender y predecir los posibles resultados competitivos entre estas especies es importante en el diseño de programas de control biológico (Bokonon-Ganta et al. 2005; García-Medel et al. 2007; Wang et al. 2008; Paranhos et al. 2013; Aluja et al. 2013).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la competencia intrínseca entre *D. longicaudata* como invasor y *D. areolatus* y *U. anastrephae* como residentes, así como la competencia intrínseca entre *U. anastrephae* como invasor y *D. areolatus* como residente.

2. Materiales y métodos

2.1. Área de estudio

El estudio se realizó en el municipio de Medellín de Bravo, en la región centro costera de Veracruz, México, la cual se caracteriza por presentar una alta densidad de hospederos de *A. obliqua* como el cultivo del mango (*Mangifera indica* L.), plantas nativas y de traspatio como ciruelas del género *Spondias* y guayaba (*Psidium guajava* L.). Esta zona se encuentra entre los 19° 00' y 18° 55' latitud Norte y 96° 10' y 96° 13' longitud Oeste, con una altitud promedio de 18.5 msnm. El clima es semihúmedo, con una precipitación media anual de 1,358 mm con un periodo de lluvias muy marcado de junio a septiembre. La mayor temperatura promedio (29.1°C) se produce en el mes de mayo y el promedio más bajo (21.4 °C), en el mes de enero (SMN 2010).

2.2 Material biológico

Los frutos de jobo sobre los que se realizaron los diferentes ensayos se obtuvieron de árboles ubicados en zonas marginales, cerca de huertos de mango cv. Manila, los cuales proporcionan recursos de manera natural para la presencia de moscas y parasitoides en esta zona.

Ya que *D. areolatus* actúa en instares más tempranos que *D. longicaudata* y *U. anastrephae* (Murillo et al. 2015), las evaluaciones con esta especie se realizaron en frutos con larvas de tercer instar de *A. obliqua* previamente parasitadas en campo por *D. areolatus*. Para esto se colectaron 1440 frutos de jobo (*Spondias mombin*) maduros, con signos de infestación por *A. obliqua* y con un registro de parasitismo de *D. areolatus* del 98%.

Para la evaluación donde no participó *D. areolatus*, se ocuparon 1080 frutos de jobo maduros que fueron previamente protegidos con bolsas (\approx 8 frutos por bolsa) en el árbol para su posterior infestación artificial con 15 hembras grávidas de *A. obliqua* por bolsa, proporcionadas por el Programa Moscafrut, SAGARPA-SENASICA. Estas hembras se mantuvieron en el interior de las bolsas por 48 h, con agua y alimento (azúcar más levadura hidrolizada enzimáticamente en proporción 3:1). La fruta fue embolsada antes de ser infestada, utilizando 3 árboles por sitio en dos sitios y se

colectó 12 días después de la infestación, previa inspección para corroborar la presencia de larvas L3.

En las evaluaciones con los parasitoides invasores, por cada tratamiento y repetición se utilizaron 30 hembras grávidas de *D. longicaudata* y *U. anastrephae*, proporcionadas por el Programa Moscafrut, SAGARPA-SENASICA.

2.3. Competencia intrínseca entre residentes e invasores

Se evaluó por separado la competencia intrínseca entre *D. areolatus* como residente y las especies *D. longicaudata* y *U. anastrephae* como invasoras, utilizando jaulas plexiglass (30x30x30 cm) como arena experimental. En estas jaulas se colocaron como unidad de parasitación 30 frutos de jobo con un promedio de 6 larvas/frutos de *A. obliqua*, en su mayoría de tercer instar, 30 parasitoides hembras de cada especie invasora en exposición independiente durante cuatro horas. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Fruta infestada y previamente parasitada en campo por *D. areolatus* (testigo), 2) Fruta infestada y previamente parasitada en campo por *D. areolatus* y expuesta al invasor (*D. longicaudata* o *U. anastrephae*) y 3) Fruta infestada expuesta solamente al invasor.

Para la competencia intrínseca entre *U. anastrephae* como residente y *D. longicaudata* como invasor, se utilizaron el mismo número de parasitoides hembras y frutos, con los siguientes tratamientos: 1) Fruta infestada expuesta a *U. anastrephae* (testigo), 2) Fruta infestada expuesta a *U. anastrephae* y posterior exposición a *D. longicaudata* y 3) Fruta infestada expuesta a *D. longicaudata*.

Al finalizar las exposiciones, la fruta fue removida de las jaulas y colocada en cajas de unicel para su maduración. A los cuatro días de exposición se sacaron cinco frutos de cada caja de maduración, se disectaron y se extrajeron las larvas de *A. obliqua*, las cuales se disectaron utilizando un Microscopio Estereoscópico Carl Zeiss Smz -168®, con la finalidad de buscar evidencia de parasitismo, superparasitismo y competencia intrínseca. Las larvas de cada especie de parasitoide se identificaron de acuerdo a las características morfológicas descritas en Murillo et al. (Sometido a la revista *Arthropod Structure & Development*).

A los siete días se removió el resto de los frutos de cada caja de maduración, se disectaron y se extrajeron las larvas y pupas, los cuales se colocaron en contenedores de plástico de 10 cm de diámetro por 25 cm de altura y cubiertos con una tapa perforada forrada con tela de organza y arena estéril como sustrato de oviposición, para que terminaran su desarrollo. Después de la emergencia de adultos se contabilizó el número de adultos y proporción sexual de cada especie de parasitoide y mosca. En ambos tipos de pruebas se realizaron 12 repeticiones.

2.3. Análisis de datos

Las variables de respuesta consistieron en los porcentajes (\pm EE) de: a) larvas vivas de parasitoides, b) larvas de *A. obliqua* parasitadas por larvas vivas del parasitoide, c) larvas de *A. obliqua* superparasitadas por larvas vivas del parasitoide, d) porcentaje de parasitismo y e) proporción de machos. Los porcentajes fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada. El porcentaje de parasitismo se calculó considerando el número de parasitoides que emergieron dividido por la suma del número de parasitoides y moscas que emergieron x cien.

Se compararon los tratamiento por especie de parasitoide utilizando un análisis de varianza y las medias fueron separadas por la prueba de Tukey ($\alpha= 0.05$). Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, 2008).

3. Resultados

El porcentaje de larvas vivas de *D. areolatus* disminuyó significativamente ($P= 0.0001$) cuando *D. longicaudata* y *U. anastrephae* actuaron como invasores (39.8 y 29.4%), respectivamente, sin que éstos se vieran afectados por la presencia de *D. areolatus* como residente (Cuadro 1). En las disecciones todas las larvas de los parasitoides se encontraron como larvas L1, en pocos casos se pudieron observar vivas a las larvas de las dos especies competidoras (Figura 1a y 1b). De manera frecuente la larva de *D. areolatus* se observó muerta con apariencia oscura y encogida (Figura 2a y 2b) y en algunos casos con daño físico en el cuerpo en presencia del competidor (Figura 3a y

3b). El porcentaje de larvas vivas de *U. anastrephae* como residente disminuyó significativamente ($P= 0.0001$) cuando *D. longicaudata* actuó como invasor (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje (\pm EE) de larvas vivas de *D. areolatus*, *U. anastrephae* y *D. longicaudata* en cada uno de los tratamientos. Observadas en el interior de larvas de *A. obliqua*.

Tratamientos	Larvas vivas de parasitoides	
	RESIDENTE	INVASOR
	<i>D. areolatus</i>	vs
		<i>D. longicaudata</i>
	$P= 0.0001$	
<i>D. areolatus</i> (Testigo)	100.0 \pm 0.1 a	-----
<i>D. areolatus</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	60.2 \pm 4.2 b	96.0 \pm 0.03 a
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	-----	100.0 \pm 0.01 a
	<i>D. areolatus</i>	vs
		<i>U. anastrephae</i>
	$P= 0.0001$	
<i>D. areolatus</i> (Testigo)	100.0 \pm 0.1a	-----
<i>D. areolatus</i> \rightarrow <i>U. anastrephae</i>	70.6 \pm 5.9b	98.0 \pm 0.01 a
<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	-----	100.0 \pm 0.01 a
	<i>U. anastrephae</i>	vs
		<i>D. longicaudata</i>
	$P= 0.0001$	$P= 0.0001$
<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	100.0 \pm 0.1 a	-----
<i>U. anastrephae</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	58.6 \pm 2.2 b	26.8 \pm 3.2 a
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	-----	100.0 \pm 0.1 b

\rightarrow = exposición posterior. Medias dentro de las columnas y tratamientos seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes. E.E.= Error Estándar, n= 30.

Las larvas muertas de *D. longicaudata* se observaron pequeñas o dañadas físicamente en presencia de una larva viva de *U. anastrephae* (Figura 4a), las larvas muertas de *U. anastrephae* también se observaron de menor tamaño y en presencia de dos o más larvas vivas de *D. longicaudata* (Figura 4b).

El porcentaje de larvas de *A. obliqua* parasitadas por larvas vivas de *D. areolatus* y *D. longicaudata* disminuyó significativamente ($P= 0.0001$) cuando éstos compitieron entre sí y cuando compitieron con *U. anastrephae* (Cuadro 2). *U. anastrephae* fue la única especie que mantuvo su cuota de parasitación de larvas de *A. obliqua* siendo invasor o residente (Cuadro 2).

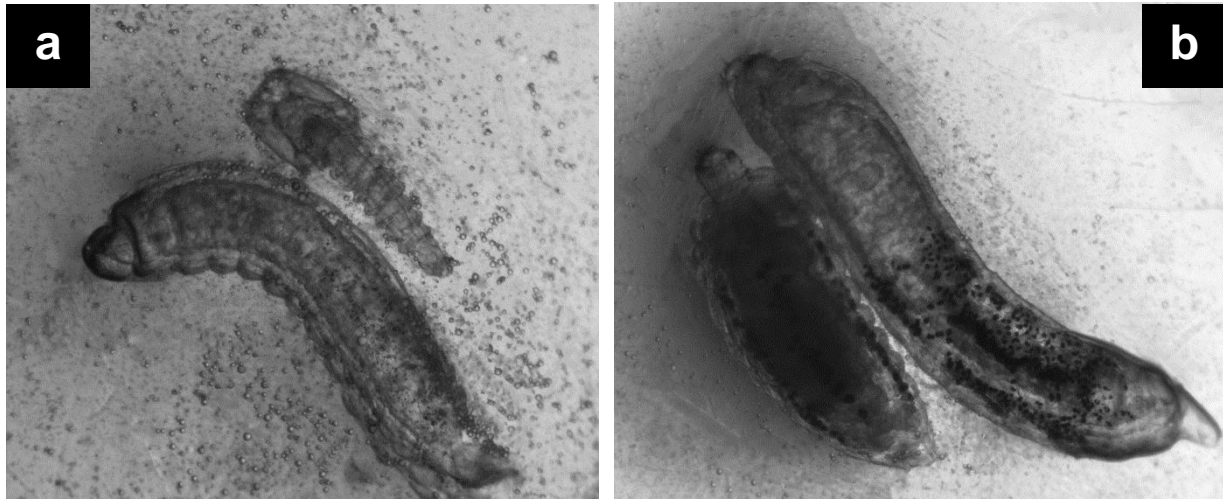


Figura 1. Larvas L1 de *D. areolatus* vivas en competencia intrínseca, a) en presencia de una larva L1 viva de *D. longicaudata* y b) en presencia de una larva L1 viva de *U. anastrephae*. Tomada con una cámara Motic Plus 2.0®, utilizando un Microscopio Estereoscópico Carl Zeiss Smz -168 ® en 2x.



Figura 2. Larvas *D. areolatus* muertas en competencia intrínseca, a) en presencia de una larva vivas de *D. longicaudata* y b) en presencia de una larva de *U. anastrephae*. Tomada con una cámara Motic Plus 2.0®, utilizando un Microscopio Estereoscópico Carl Zeiss Smz -168 ® en 4x.



Figura 3. Larvas de *D. areolatus* muertas y dañadas físicamente en competencia intrínseca, a) se indica el daño en presencia de una larva viva de *D. longicaudata* y b) se indica el daño en presencia de una larva muerta y otra viva de *U. anastrephae*. Tomadas con una cámara Motic Plus 2.0®, utilizando un Microscopio Estereoscópico Carl Zeiss Smz -168 ® en 3 y 2x respectivamente.

Las especies que superparasitaron al hospedero fueron *D. longicaudata* (3-7 larvas parasitoide/larva mosca) y *U. anastrephae* (2-3 larvas parasitoide/larva de mosca) (Figura 4a y 4b), siendo *D. longicaudata* el que provocó un mayor porcentaje de larvas superparasitadas (Cuadro 2); sin embargo, este porcentaje disminuyó significativamente en presencia del residente *D. areolatus* y en competencia con *U. anastrephae*. El porcentaje de superparasitismo de *U. anastrephae* no fue afectado cuando actuó como invasor ante *D. areolatus* o residente ante *D. longicaudata* (Cuadro 2).

El porcentaje de parasitismo de *D. areolatus* disminuyó significativamente ($P=0.0001$) un 31.5 y 60.8% cuando compitió con los invasores *D. longicaudata* y *U. anastrephae* respectivamente (Cuadro 3). El parasitismo de *D. longicaudata* disminuyó un 44.6 y 41.6 % en presencia de los residentes *D. areolatus* y *U. anastrephae* respectivamente. El parasitismo de *U. anastrephae* solo fue afectado cuando fue residente (Cuadro 3).

La proporción de machos no fue afectada debido a la competencia; no obstante, se notó que *D. longicaudata* tuvo la menor proporción de machos en relación a *D. areolatus* y *U. anastrephae* (Cuadro 3).

Cuadro 2. Porcentaje (\pm EE) de larvas de *A. obliqua* parasitadas y superparasitadas por larvas vivas de *D. areolatus*, *U. anastrephae* y *D. longicaudata* en cada tratamiento.

Tratamientos	RESIDENTE		INVASOR		
	Parasitadas	Superparasitadas	Parasitadas	Superparasitadas	
	<i>D. areolatus</i>		vs	<i>D. longicaudata</i>	
	<i>P</i> = 0.0001			<i>P</i> = 0.0001 <i>P</i> = 0.0001	
<i>D. areolatus</i> (Testigo)	93.2 \pm 2.1 a	0.0		-----	-----
<i>D. areolatus</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	48.9 \pm 4.1 b	0.0		39.9 \pm 3.5 a	19.1 \pm 3.2 a
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	-----	-----		86.8 \pm 4.1 b	70.6 \pm 3.4 b
	<i>D. areolatus</i>		vs	<i>U. anastrephae</i>	
	<i>P</i> = 0.0001			<i>P</i> = 0.1273 <i>P</i> = 0.0834	
<i>D. areolatus</i> (Testigo)	90.4 \pm 4.3 a	0.0		-----	-----
<i>D. areolatus</i> \rightarrow <i>U. anastrephae</i>	39.9 \pm 2.9 b	0.0		57.4 \pm 7.3 a	10.7 \pm 3.5 a
<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	-----	-----		64.9 \pm 3.2 a	19.8 \pm 3.0 a
	<i>U. anastrephae</i>		vs	<i>D. longicaudata</i>	
	<i>P</i> = 0.2342	<i>P</i> = 0.2162		<i>P</i> = 0.0001 <i>P</i> = 0.0001	
<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	64.9 \pm 3.2 a	19.8 \pm 3.0 a		-----	-----
<i>U. anastrephae</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	63.8 \pm 4.3 a	20.3 \pm 3.5 a		56.1 \pm 2.1 a	28.3 \pm 2.1 a
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	-----	-----		86.8 \pm 4.1 b	70.6 \pm 3.4 b

\rightarrow = exposición posterior. Medias dentro de las columnas y tratamientos seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) y a la separación de medias por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). E.E.= Error Estándar, n= 30.

Cuadro 3. Porcentaje (\pm EE) de parasitismo y proporción de machos de *D. areolatus*, *U. anastrephae* y *D. longicaudata* en cada tratamiento.

Tratamientos	RESIDENTE		INVASOR		
	Parasitismo	Proporción de machos	Parasitismo	Proporción de machos	
	<i>D. areolatus</i>		vs	<i>D. longicaudata</i>	
	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001		<i>P</i> = 0.0001	
<i>D. areolatus</i> (Testigo)	87.4 \pm 4.3 a	0.42 \pm 0.05 a		-----	-----
<i>D. areolatus</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	55.9 \pm 3.7 b	0.46 \pm 0.07 a		33.7 \pm 2.4 a	0.39 \pm 0.06 a
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	-----	-----		78.3 \pm 6.1 b	0.34 \pm 0.05 a
	<i>D. areolatus</i>		vs	<i>U. anastrephae</i>	
	<i>P</i> = 0.0001	<i>P</i> = 0.0001		<i>P</i> = 0.2342	<i>P</i> = 0.2162
<i>D. areolatus</i> (Testigo)	87.4 \pm 4.3 a	0.42 \pm 0.1 a		-----	-----
<i>D. areolatus</i> \rightarrow <i>U. anastrephae</i>	26.6 \pm 6.2 b	0.45 \pm 0.1 a		58.5 \pm 7.1 a	0.63 \pm 0.1 a
<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	-----	-----		64.2 \pm 4.1 a	0.54 \pm 0.3 a
	<i>U. anastrephae</i>		vs	<i>D. longicaudata</i>	
	<i>P</i> = 0.1273	<i>P</i> = 0.0834		<i>P</i> = 0.0001	
<i>U. anastrephae</i> (Testigo)	64.2 \pm 4.1 a	0.54 \pm 0.03 a		-----	-----
<i>U. anastrephae</i> \rightarrow <i>D. longicaudata</i>	32.8 \pm 4.3 b	0.32 \pm 0.02 a		36.7 \pm 3.1 a	0.32 \pm 0.07a
<i>D. longicaudata</i> (Testigo)	-----	-----		78.3 \pm 6.1 b	0.34 \pm 0.05a

\rightarrow = exposición posterior. Medias dentro de las columnas y tratamientos seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) y a la separación de medias por la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). E.E.= Error Estándar, n= 150.

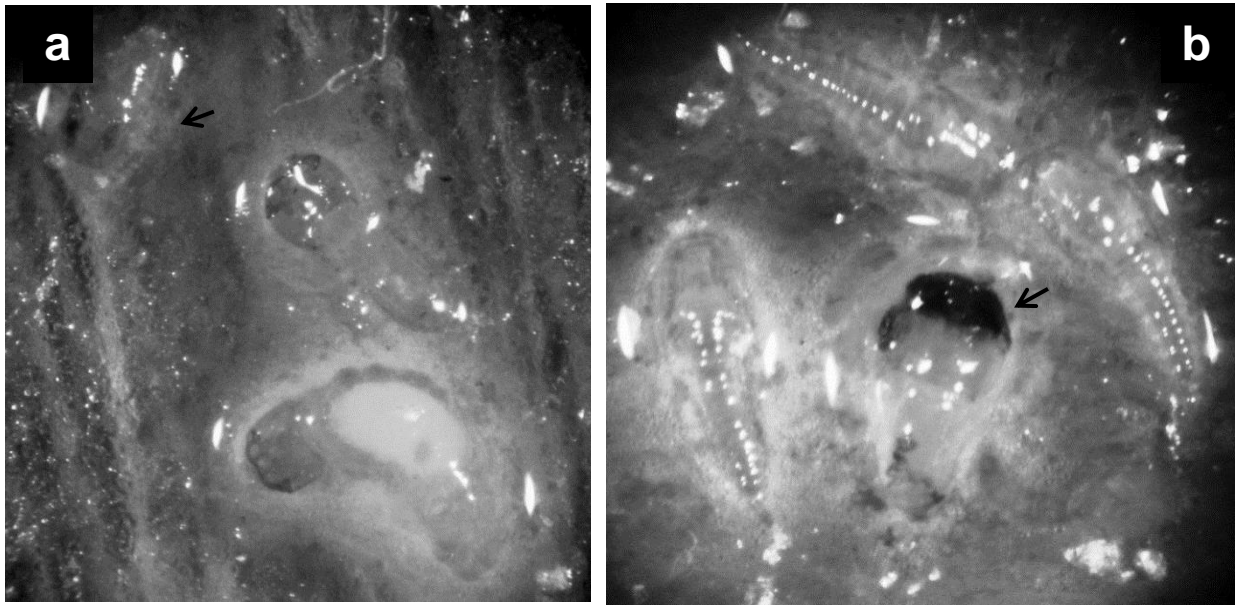


Figura 4. Larva de *D. longicaudata* y *U. anastrephae* muertas en competencia intrínseca, a) se indica una larva de *D. longicaudata* muerta en presencia de una larva viva y otra muerta de *U. anastrephae* y b) se indica una larva de *U. anastrephae* muerta en presencia de tres larvas de *D. longicaudata* vivas. Tomadas con una cámara Motic Plus 2.0®, utilizando un Microscopio Estereoscópico Carl Zeiss Smz - 168 ® en 2x.

4. Discusión

Nuestros resultados demuestran que la competencia intrínseca establecida entre *D. areolatus*, *U. anastrephae* y *D. longicaudata* generó que el parasitismo de cada especie fuera afectado de forma negativa, resultando *U. anastrephae* como el menos afectado en su cuota de parasitación como residente e invasor.

En la competencia intrínseca, las larvas de *D. areolatus* fueron más adversamente afectadas por la presencia de *D. longicaudata* o *U. anastrephae* que viceversa, a pesar de la ventaja de ser residente como larva de mayor tamaño ante la presencia de huevos o larvas pequeñas en tamaño de los invasores, los cuales aparentemente podrían haber sido afectados de manera fisiológica o física por el residente, como se ha documentado para otros parasitoides de acción temprana (Wang et al. 2003; Bokonon-Ganta et al. 2007, Wang et al. 2008) como *F. ceratitivorus* cuando compite con *D. longicaudata*. Sin embargo, parece que éste no es el caso de *D. areolatus*, el cual aparentemente no presenta una defensa de supresión fisiológica o física en contra de

los invasores. Las mandíbulas de la larva de primer instar *D. areolatus* no parece presentar una ventaja física contra huevos y larvas recién eclosionadas de *U. anastrephae* y *D. longicaudata* (Aluja et al. 2013; Paranhos et al. 2013), pues no se observaron individuos dañados físicamente de estas últimas especies. Los resultados de Murillo et al. (Sometido a la revista *Arthropod Structure & Development*) sugiere que las mandíbulas grandes de las larvas de primer instar de *U. anastrephae* y *D. longicaudata* y mayor rapidez en su movilidad, contribuyan en la ventaja competitiva de estas especies sobre *D. areolatus*.

El comportamiento de *U. anastrephae* como invasor frente a *D. areolatus* como residente fue consistente con lo reportado por Aluja et al. (2013), corroborando que las grandes mandíbulas de la larva de primer instar de *U. anastrephae* son utilizadas como mecanismo para la eliminación de los competidores, como se muestra en la Figura 3b. La coexistencia de *D. areolatus* y *U. anastrephae* también podría estar relacionada en la capacidad de discriminación de *U. anastrephae*, de atacar larvas ya parasitadas por heteroespecíficos (Sivinski et al. 2001), ya que éste posee una cantidad relativamente baja de huevos disponibles, los cuales intentará colocar preferencialmente en hospederos no parasitados (Aluja et al. 2013).

Nuestros resultados con *D. longicaudata* sobre las larvas de *D. areolatus* no es consistente a lo reportado por Paranhos et al. (2013), ya que no se observó ventaja de *D. longicaudata* pues su parasitismo se redujo significativamente en hospederos previamente parasitados por *D. areolatus*. Es probable que los porcentajes de parasitismo (y superparasitismo) de *D. longicaudata* en presencia del residente *D. areolatus* puedan estar influenciados por un comportamiento de discriminación que de competencia intrínseca, dado que *D. longicaudata* resultó victorioso en competencia intrínseca y su parasitismo fue mayor en hospederos libres de residente. También es posible que las condiciones experimentales de nuestro trabajo (residente natural, larva de *A. obliqua* y hospedero frutal nativo) hayan contribuido a que *D. longicaudata* parasitara menos cantidad de larvas con el residente, ya que se ha encontrado de manera más abundante en frutos grandes y comerciales, frecuentemente exóticos, tales como mango y *Citrus* spp. (López et al. 1999), los cuales están libres o con menos presencia del residente nativo (López et al. 1999). Lo anterior sugiere que *D.*

longicaudata tiene menor probabilidad para ocasionar una extinción local por desplazamiento de *D. areolatus*, ya que la competencia entre ambas especies se disminuiría por una aparente separación de nichos (Hackett-Jones et al. 2009).

En la competencia intrínseca entre *D. longicaudata* y *U. anastrephae* ambas resultaron igualmente afectadas en su parasitismo, como se ha reportado en condiciones de laboratorio (Paranhos et al. 2013; Murillo et al. en preparación). La resistencia de *U. anastrephae* a la competencia intrínseca con *D. longicaudata* y un posible mejor desempeño cuando el hospedero se localiza en las *Spondias*, pueden ser las causas de que en campo *U. anastrephae* pueda mantener mayores proporciones a los de *D. longicaudata* en los frutales del género *Spondias* (López et al. 1999). De tal manera que parece que hay pocas razones para preocuparse por los efectos de *D. longicaudata* sobre el nativo *U. anastrephae*, ejemplo de esto puede ser el caso de Florida, USA, donde a pesar de las liberaciones de *D. longicaudata*, *U. anastrephae* se encuentra bien distribuida, incluso abarcando el mismo rango que el invasor (Eitam et al., 2004).

De acuerdo con nuestros resultados podemos concluir que *D. areolatus* es un competidor intrínseco inferior en competencia con *U. anastrephae* o *D. longicaudata* a pesar de tener una acción temprana y ser residente en el hospedero utilizado; pero existen mecanismos competitivos propios de *D. longicaudata*, probablemente relacionadas con la discriminación de hospederos previamente parasitados por *D. areolatus*, que compensan esta inferioridad intrínseca de *D. areolatus*, haciendo que la competencia sea similar, lo cual ratifica que las liberaciones de *D. longicaudata* en programas de control biológico por aumento no afectarán a *D. areolatus*. *U. anastrephae* resistió la presencia competitiva de *D. longicaudata*, lo cual sugiere que podría ser utilizado como un agente de control biológico complementario contra moscas de la fruta *A. obliqua* en hospederos frutales como *Spondias*.

Agradecimientos

A Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga (Dirección General de Sanidad Vegetal) por el material biológico proporcionado para este trabajo. A MC. Javier Valle-Mora (ECOSUR) por la asistencia en los análisis estadísticos. A Gerardo de Jesús Alonso Valenzuela,

por su apoyo en el trabajo de campo. Este estudio recibió financiamiento a través del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT Proyecto No. 24031. Se agradece al CONACYT por la beca otorgada a Félix D. Murillo para sus estudios de Doctorado.

Literatura Citada

- Aluja M, Ovruski SM, Sivinski J, Córdova-García G, Schliserman P, Núñez-Campero SR, Ordano M (2013) Inter-specific competition and competition-free space in the tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecological Entomology* 38: 485–496
- Bokonon-Ganta AH, Ramadan MM, Messing RH (2007) Reproductive biology of *Fopius ceratitivorus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg–larval parasitoid of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 41: 361–367
- Bokonon-Ganta AH, Ramadan MM, Wang XG, Messing RH (2005) Biological performance and potential of *Fopius ceratitivorus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg larval parasitoid of tephritid fruit flies newly imported to Hawaii. *Biological Control* 33: 238–247
- Eitam A, Sivinski J, Holler T, Aluja M (2004) Biogeography of braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Florida. *Annals of the Entomological Society of America* 97: 928–939
- Garcia FRM, Corseuil E (2004) Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Santa Catarina state, Brazil. *Florida Entomologist* 87(4): 517-521
- García-Mendel D, Sivinski J, Díaz-Fleischer F, Ramírez-Romero R, Aluja M (2007) Foraging behavior by six fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) released as single- or multiple-species cohorts in field cages: Influence of fruit location and host density. *Biological Control* 43:12-22
- Hackett-Jones E, Cobbold CA, White A (2009) Coexistence of multiple parasitoids on a single host due to differences in parasitoid phenology. *Theoretical Ecology* 2: 19–31

- Hernández-Ortiz V, ALUJA M (1993) Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomologica Mexicana* 88: 89-105
- Kroder S, Messing RH (2010) A new parasitoid from Kenya, *Fopius ceratitivorus*, complements the extant parasitoid guild attacking Mediterranean fruit fly in Hawaii. *Biological Control* 53: 223–229
- López M, Aluja M, Sivinski J (1999) Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biological Control* 15:119–129
- Miranda M, Sivinski J, Rull J, Cicero L, Aluja M (2015) Niche breadth and interspecific competition between *Doryctobracon crawfordi* and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), native and introduced parasitoids of *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 82: 86–95
- SMN (2010) National Meteorological Service (Servicio Meteorológico Nacional). Normal values (1971-2000) for Medellín de Bravo, Veracruz (Valores normales de 1971-2000 para Medellín de Bravo, Veracruz). [On line] available: <http://smn.cna.gob.mx/> [Accessed 22 October 2014]
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M (2000) Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 18: 216–224
- Murillo FD, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Liedo P, Montoya P (2015) *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Journal of Hymenoptera Research* 46: 91–105
- Palacio IP, Ibrahim AB, Ibrahim R (1991) Interspecific competition among opiinae parasitoids of the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Philippine Entomol.* 8: 1087–1097
- Paranhos BJ, Sivinski J, Stuhl C, Holler T, Aluja M (2013) Intrinsic competition and competitor-free-space influence the coexistence of parasitoids (Hymenoptera:

- Braconidae: Opiinae) of neotropical Tephritidae (Diptera). *Environmental Entomology* 42: 717-723
- Pedersen BS, Mills NJ (2004) Single vs. multiple introduction in biological control: the roles of parasitoid efficiency, antagonism and niche overlap. *Journal of Applied Ecology* 41: 973–984
- SAS Institute (2008) SAS 9.4 online documentation. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
- Sivinski J, Vulinec K, Aluja M (2001) Ovipositor length in a guild of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) attacking *Anastrepha* spp. Fruit flies (Diptera: Tephritidae) in southern Mexico. *Annals of the Entomological Society of America*. 94: 886–895
- Sivinski JM, Piñero J, Aluja M (2000) The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control* 18:258-269
- Sivinski J, Aluja M, Holler T, Eitam A (1998) Phenological comparison of two braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 27: 360-365
- Sivinski J, Aluja M, López M (1997) Spatial and temporal distributions of parasitoids of the Mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 604-618
- Sivinski J, Calkins CO, Baranowski R, Harris D, Brambila J, Diaz J, Burns R, Holler T, Dobson G (1996) Suppression of a Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) population through augmentative releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 6: 177-185
- Wang XG, Bokonon-Ganta A, Messing R (2008) Intrinsic inter-specific competition in a guild of tephritid fruit fly parasitism: effects of co-evolutionary history on competitive superiority. *Biological Control* 44: 312-320
- Wang XG, Messing RH, Bautista RC (2003) Competitive Superiority of Early Acting Species: A Case Study of Opiine Fruit Fly Parasitoids. *Biocontrol Science and Technology*. 13: 391-402

CAPITULO V

Liberaciones por aumento de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae): efecto sobre las poblaciones de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) y su parasitismo natural

Félix D. Murillo^a, Pablo Montoya^b, Héctor Cabrera-Mireles^a Juan F. Barrera^a y Pablo Liedo^a

^a El Colegio de la Frontera Sur. Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5. Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico.

^b Programa Moscafrut, SENASICA-SAGARPA. Camino a los Cacaotales S/N, Metapa de Domínguez, CP 30860, Chiapas, México.

Corresponding author: Félix D. Murillo (El Colegio de la Frontera Sur. Carretera Antiguo Aeropuerto km 2.5. Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico. Phone +52 (962) 628 9800, ext.5604. fmurillo@ecosur.edu.mx).

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las liberaciones por aumento del parasitoide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* sobre las poblaciones *Anastrepha* spp. y sobre el parasitismo natural en 12 tipos de frutales hospederos, en dos sitios experimentales (“A” y “B”). Durante el ciclo 2013-14, los parasitoides fueron liberados en un sitio mientras que el otro sitio se utilizó como control. Durante el ciclo 2014-15, los tratamientos en cada uno de los sitios se invirtieron para hacer las comparaciones sobre una base espacial y temporal. El efecto de las liberaciones de parasitoides en el número de larvas por fruto entre sitios fue significativo en el primer ciclo en guayabas y en el total. En el segundo ciclo solo hubo diferencias significativas en naranjas. Entre ciclos en el mismo sitio el efecto de las liberaciones fue mayor en el sitio “A” en guayabas, mangos, naranjas y el total. En el sitio “B” solo hubo diferencias significativas en naranjas. Al comparar el parasitismo entre sitios en el mismo ciclo, se registró un incremento significativo de 32.3% en guayabas, 39.5% en mango, 16.7% en naranja y 22.9% en el total en el primer ciclo; en el segundo ciclo solo se registró un incremento significativo de 13.5% en mango. Al comparar el parasitismo entre ciclos en el mismo sitio, el sitio “A” registró un incremento significativo de 13.5% en mango y 9.1% en naranja; en el sitio “B” un incremento significativo de 17.1% en guayaba, 39.5% en mango y 14.9% en el total.

Palabras claves: Control biológico, *A. obliqua*, *D. areolatus*, *Spondias*, mango, competencia

1. INTRODUCCIÓN

Las liberaciones masivas de parasitoides constituyen una estrategia denominada control biológico por aumento (CBA), que representa una alternativa para la supresión de moscas de la fruta (Knipling, 1992, Sivinski et al. 1996, Montoya y Cancino, 2004, Montoya et al. 2007).

El CBA se ha practicado en México a través de las liberaciones del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) para el control biológico de moscas de la fruta *Anastrepha* y de algunos brotes de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (López et al. 1999; Montoya et al. 2005; Montoya et al. 2007).

Diachasmimorpha longicaudata es una especie originaria de la región Indo-Filipinas donde ataca a especies del género *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) (Wharton y Marsh, 1978). Fue introducida en diversas partes de la región Neotropical (Ovruski et al. 2000), donde coexiste con parasitoides nativos como *Doryctobracon areolatus* (Szepliget) y *Utetes anastrephae* (Viereck) (Braconidae: Opiinae) que atacan *Anastrepha* spp. en frutales nativos y exóticos (López et al. 1999, Sivinski et al. 2000, Ovruski et al. 2000). Se le ha considerado como candidato con potencial para el CBA, ya que los métodos para su cría en masa y liberación se han desarrollado en diferentes partes del mundo (Sivinski, 1996a, Montoya y Cancino, 2004, Montoya et al. 2007). Sus liberaciones por aumento han reducido de manera sustancial poblaciones de *C. capitata* en Costa Rica, *A. suspensa* (Loew) en Florida y *A. obliqua* (Macquart) y *A. ludens* (Loew) en México (Camacho, 1994, Burns et al. 1996, Sivinski et al. 1996b, Montoya et al. 2000a).

Después de ser introducida en diferentes países, *D. longicaudata* ha sido reportado parasitando *Anastrepha* spp., *C. capitata* y *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Wharton et al. 1981, Wong et al. 1984, Jirón y Mexzon, 1989, Aluja et al. 1990, Eskafi, 1990, Baranowsky et al. 1993, López et al. 1999). En la mayoría de los casos, esta especie representó el mayor porcentaje de parasitismo en comparación con otras especies de parasitoides, especialmente en frutas cultivadas en zonas agrícolas (López et al., 1999, Sivinski et al. 2000).

Diachasmimorpha longicaudata es una especie competitiva y ejerce altos niveles de parasitismo y superparasitismo, tanto en laboratorio como en campo (Aluja et al. 1990, Sivinski et al. 1997, 2000, Montoya et al. 2000a, 2000b, 2011, 2012b, González et al. 2007, 2010). Este comportamiento puede tener un efecto negativo sobre las especies nativas, mediante la exclusión ejercida por la explotación de recursos (Sivinski et al. 1996b, Sivinski et al. 1997).

En este sentido, es poco lo que se sabe de las interacciones que se dan entre los parasitoides utilizados en el control biológico por aumento y los parasitoides nativos que ejercen un control natural, así como de la competencia interespecífica entre las especies de parasitoides involucradas. De tal forma que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las liberaciones por aumento de *D. longicaudata* sobre *Anastrepha* spp. y su parasitismo natural en diferentes hospederos frutales en la región central del estado de Veracruz, México.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Área de estudio

El estudio se realizó en la región centro costa de Veracruz, municipio de Medellín de Bravo, a 25 km del puerto de Veracruz, la cual se caracteriza por presentar densidades importantes de hospederos de *Anastrepha* spp. como mango (*Mangifera indica* L.) cv. Manila principalmente y naranja agria (*Citrus aurantium* L.), y plantas nativas de ciruelas del género *Spondias* y guayaba (*Psidium guajava* L.), que les proporcionan un recurso para sobrevivir todo el año. Estos hospederos se encuentran principalmente como árboles de traspatio y huertos cercanos al río Cotaxtla. Algunos huertos de mango se encuentran rodeados de árboles de jobo (*Spondias mombin* L.) y guayaba (*P. guajava*) donde son comunes las altas poblaciones de moscas de la fruta. El área de estudio se ubicó entre los 19° 00' y 18° 55' de latitud norte y 96° 10' y 96° 13' longitud oeste, con una altitud promedio de 18.5 msnm. El clima es semihúmedo, con una precipitación media anual de 1,358 mm con un periodo de lluvias muy marcado de junio a septiembre. La temperatura media más alta 29.1°C, se presenta en el mes de junio y la media más baja, 21.4 °C, en el mes de enero (SMN, 2010). Basándonos en Montoya et

al. (2000), en esta area se delimitaron dos sitios denominados "A" y "B" de ≈ 10 ha, las cuales se subdividieron en dos parcelas de ≈ 5 ha cada una, las cuales fueron consideradas como repeticiones y fue de donde se tomaron los datos y muestras para análisis (Figura 1).

2.2. *Parasitoides*

Los parasitoides *D. longicaudata* fueron criados en masa en la planta "Moscafrut" en Metapa de Domínguez, Chiapas, de acuerdo con los procedimientos descritos por Cancino et al. (2010) y fueron enviados cada semana al área de estudio. Pupas de moscas de la fruta parasitadas fueron envasadas en contenedores cilíndricos conocidos coloquialmente como "Arturito" a una densidad de aproximadamente 3,500 pupas por contenedor. Estos contenedores fueron fabricados con cubetas de plástico de 20 litros, 30 cm de diámetro y 30 cm de alto, de color blanco con tapas, con dos ventanas de 35 x 11 cm para mantener la ventilación dentro del contenedor, estas ventanas se cubrieron con malla mosquitera de color gris de 1.5 mm de luz, tapa con un corte circular de 15 cm, el cual fue cubierto con malla del mismo calibre. En el interior del contenedor se colocaron seis tiras de plástico de 24 cm x 8 cm alternadas para aumentar la superficie de apoyo para los parasitoides emergentes y una mezcla de miel de abeja y papel higiénico (17 miel: 1 papel) como alimento para las avispa, la cual se untó en las tiras de plástico (Montoya et al. 2012a).

Los contenedores con el material biológico se colocaron en una habitación a $\approx 25 \pm 2$ °C y $65 \pm 5\%$ HR por 5 días, hasta que machos y hembras emergieron (SAGARPA-SENASICA, 2012). Diez contenedores se prepararon cada semana, con una emergencia promedio del 60%, aproximadamente 2,100 parasitoides por contenedor, y una proporción hembra: macho de 3:1. ($\approx 1,500$ parasitoides hembras/ha).

2.3. *Liberación de parasitoides*

Los parasitoides fueron liberados por vía terrestre cerca de los árboles de frutales hospederos durante dos ciclos abarcando las diferentes temporadas de fructificación de los hospederos. Las liberaciones de parasitoides fueron en base a Montoya et al. (2000), durante el ciclo 2013-14, los parasitoides fueron liberados en un sitio (B)

mientras que el otro sitio (A) se utilizó como control. En ambos sitios, el control y el sitio tratado, se contó con la presencia de mango (Manila), huertos de traspatio y cercos vivos en los cuales había una mezcla de mango de diversos cultivares y otras especies de árboles frutales (por ejemplo, cítricos, guayaba y ciruela tropical). Durante el ciclo 2014-25, los tratamientos en cada uno de los sitios se invirtieron, los parasitoides fueron liberados en un sitio (A) mientras que el otro sitio (B) se utilizó como control, para hacer las comparaciones sobre una base espacial y temporal (Figura 1).



Figura 1. Area de estudio delimitada en dos sitios denominadas "A" y "B", las cuales se subdividieron en dos parcelas de ≈ 5 ha cada uno que sirvieron en un ciclo como tratados y en otro ciclo como testigo.

2.4. Monitoreo de niveles de poblaciones de moscas y parasitoides

Se establecieron cinco puntos de muestreo, cada uno con una trampa Multilure®, en cada unidad de 5 ha dentro del huerto de mango de cada sitio. Las trampas fueron revisadas semanalmente durante los dos años. Para determinar el grado de infestación de la fruta y porcentaje de parasitismo, se colectaron frutos con signos de estar infestados en cada sitio. El número de larvas por fruto, el número de frutos, y porcentaje de parasitismo se determinaron para cada sitio. El número de frutos por muestra varió de 10 a 50 dependiendo de la disponibilidad y tamaño de éstos. Todas las muestras y los datos de trampeo se registraron cada semana.

2.5. El análisis estadístico

Se utilizó una prueba t de Student para comparar el número de larvas / fruto, número de moscas / trampa / día (MTD) y porcentaje de parasitismo en los hospederos frutales. Estas comparaciones se hicieron para el mismo ciclo entre sitios y el mismo sitio entre los ciclos, basándonos en el trabajo de Montoya et al. (2000). El porcentaje de parasitismo se calculó como el número de parasitoides que emergieron dividido entre la suma del número de parasitoides y moscas que emergieron multiplicado por cien (López et al., 1999; Sivinski et al., 2000). Se comparó el parasitismo total por especie de parasitoide en cada hospedero, así como la suma del parasitismo ocasionado por las especies encontradas por hospedero y total, en cada sitio y ciclo. Los datos expresados en porcentaje se transformaron a raíz cuadrada del arco seno antes del análisis. Los análisis se realizaron utilizando programa estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, 2008).

3. RESULTADOS

3.1. Especies frutales, moscas y parasitoides

Se muestrearon un total de 12 tipos de hospederos frutales, constituidos por cuatro especies de ciruelas del género *Spondias* (roja, cundoria, jobo y criolla), dos de naranja (*Citrus aurantium* y *C. sinensis*), tres tipos de *Psidium guajava* (criolla, pera y rosa) y

tres cultivares de *Mangifera indica* (criollo, Tommy y oro). De estos frutales emergieron cuatro especies de moscas y tres especies de parasitoides.

En *Spondias* se encontró exclusivamente la especie *A. obliqua*, y fue más abundante en las ciruelas cundoria (195 moscas en 364 frutos) y jobo (228 moscas en 578 frutos), donde también se registraron las tres especies de parasitoides, siendo *D. areolatus* el de mayor abundancia con 251 avispas, principalmente en larvas extraídas de jobo (175 avispas) y cundoria (76 avispas). *U. anastrephae* fue la especie menos abundante con solo 4 avispas y únicamente se registró en larvas de cundoria (3 avispas) y jobo (1 avispa). *D. longicaudata* se registró en larvas de cundoria y jobo (7 avispas en cada una).

En guayaba se registró la especie *A. striata* (422 moscas en 239 frutos), predominando en las variedades criolla (227 moscas en 169 frutos) y pera (195 moscas en 41 frutos), el resto de las moscas, *A. obliqua* (61 moscas) y *A. fraterculus* (19 moscas), solo se registraron en la variedad criolla. Los parasitoides *D. areolatus* (38 y 4 avispas) y *D. longicaudata* (57 y 29 avispas) predominaron en las variedades criolla y pera, respectivamente.

En mango predominó la especie *A. obliqua* con 138 moscas, registradas en la variedad criolla (114 moscas en 114 frutos) y Tommy (24 moscas en 27 frutos), el resto de las moscas fueron *A. ludens* con 13 moscas registradas en la variedad criolla. *D. longicaudata* fue la única especie de parasitoide que se registró, siendo más abundante en la variedad criolla (46 avispas).

En naranja agría se tuvo el 100% de moscas y parasitoides, registrándose 146 adultos de *A. ludens* y 18 *D. longicaudata*.

3.2. Infestación

El número promedio de larvas por fruto (l/f) en el ciclo de liberación fue de 2.9 y 3.9 l/f mientras que en el ciclo control 6.2 y 2.8 l/f en el sitio "A" y "B", respectivamente (Cuadro 1). Por hospedero en el sitio "A", las guayabas registraron en total 5.8 l/f en el ciclo con liberación y 17.4 l/f en el ciclo control, los mangos 4.2 y 10.1 l/f, las naranjas 2.2 y 7.4 l/f y las ciruelas 2.2 y 3.4 l/f, respectivamente (Cuadro 1). En el sitio "B" solo

las naranjas agrías registraron una reducción de larvas por fruto con 4.7 l/f en el ciclo con liberación y 9.2 l/f en el ciclo control (Cuadro 1).

Cuadro 1. Numero de frutos infestados, larvas y larvas por fruto en cada uno de los hospederos frutales en los sitios y ciclos con liberación de *D. longicaudata* y control.

Hospederos	Sitio "A"						Sitio "B"					
	Control Ciclo 2013-14			Con liberación Ciclo 2014-15			Con liberación Ciclo 2013-14			Control Ciclo 2014-15		
	f	l	l/f	f	l	l/f	f	l	l/f	f	l	l/f
Ciruela roja (<i>S. purpurea</i>)	75	216	2.9	7	19	2.7	38	72	1.9	20	29	1.5
Ciruela jobo (<i>S. mombin</i>)	68	227	3.3	57	139	2.4	267	957	3.6	186	338	1.8
Ciruela cundurora (<i>S. dioica</i>)	79	324	4.1	72	132	1.8	205	663	3.2	8	18	2.3
Ciruela criollo (<i>Spondias</i> sp.)	27	76	2.8	7	19	2.7	38	77	2.0	36	46	1.3
Ciruelas (<i>Spondias</i> spp.)	249	843	3.4	143	309	2.2	548	1769	3.2	250	431	1.7
Guayaba criolla	13	195	15.0	15	70	4.7	123	593	4.8	18	55	3.1
Guayaba pera	21	532	25.3	7	67	9.6	8	92	11.5	5	32	6.4
Guayaba rosa	17	161	9.5	3	7	2.3	4	12	3.0	5	12	2.4
Guayabas (<i>Psidium guajava</i>)	51	888	17.4	25	144	5.8	135	697	5.2	28	99	3.5
Mango criollo	16	173	10.8	32	134	4.2	60	472	7.9	6	44	7.3
Mango Tommy	10	86	8.6	0	0	0.0	14	77	5.5	3	11	3.7
Mango Oro	3	34	11.3	0	0	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0
Mangos (<i>Mangifera indica</i>)	29	293	10.1	32	134	4.2	74	549	7.4	9	55	6.1
Naranja agría (<i>C. aurantium</i>)	23	171	7.4	6	13	2.2	3	14	4.7	36	331	9.2
Naranja dulce (<i>C. sinensis</i>)	0	0	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0	0	0	0.0
Naranjas (<i>Citrus</i> spp.)	23	171	7.4	6	13	2.2	3	14	4.7	36	331	9.2
Total/Promedios	352	2195	6.2	206	600	2.9	760	3029	3.9	323	916	2.8

f= fruto infestado, l= larvas, l/f = larvas por frutos.

El efecto de las liberaciones de parasitoides en el número de larvas por fruto hospedero (l/f) entre sitios en el mismo ciclo (Figura 2) fue significativo para el primer ciclo en el hospedero guayaba con una reducción de 12.2 l/f ($t_{2.5}$; $P = 0.021$) y en el total con una reducción de 4.5 l/f ($t_{2.5}$; $P = 0.017$) (Figura 2a). En el segundo ciclo solo hubo diferencias significativas en el hospedero naranja con una reducción de 7.5 l/f ($t_{2.3}$; $P = 0.0021$) (Figura 2b). Entre ciclos en el mismo sitio (Figura 3) el efecto de las

liberaciones fue mayor en el sitio "A", donde la infestación en guayabas tuvo una reducción significativa de 11.6 l/f ($t_{2.3}$; $P = 0.0306$), mango 5.9 l/f ($t_{2.7}$; $P = 0.0017$), naranjas 5.4 l/f ($t_{7.3}$; $P = 0.001$) y el total 6.0 l/f ($t_{2.1}$; $P = 0.0385$) (Figura 3a). En el sitio "B" el efecto de las liberaciones solo se observó en las naranjas, las cuales tuvieron una reducción significativa de 4.8 l/f ($t_{2.3}$; $P = 0.0285$) (Figura 3b).

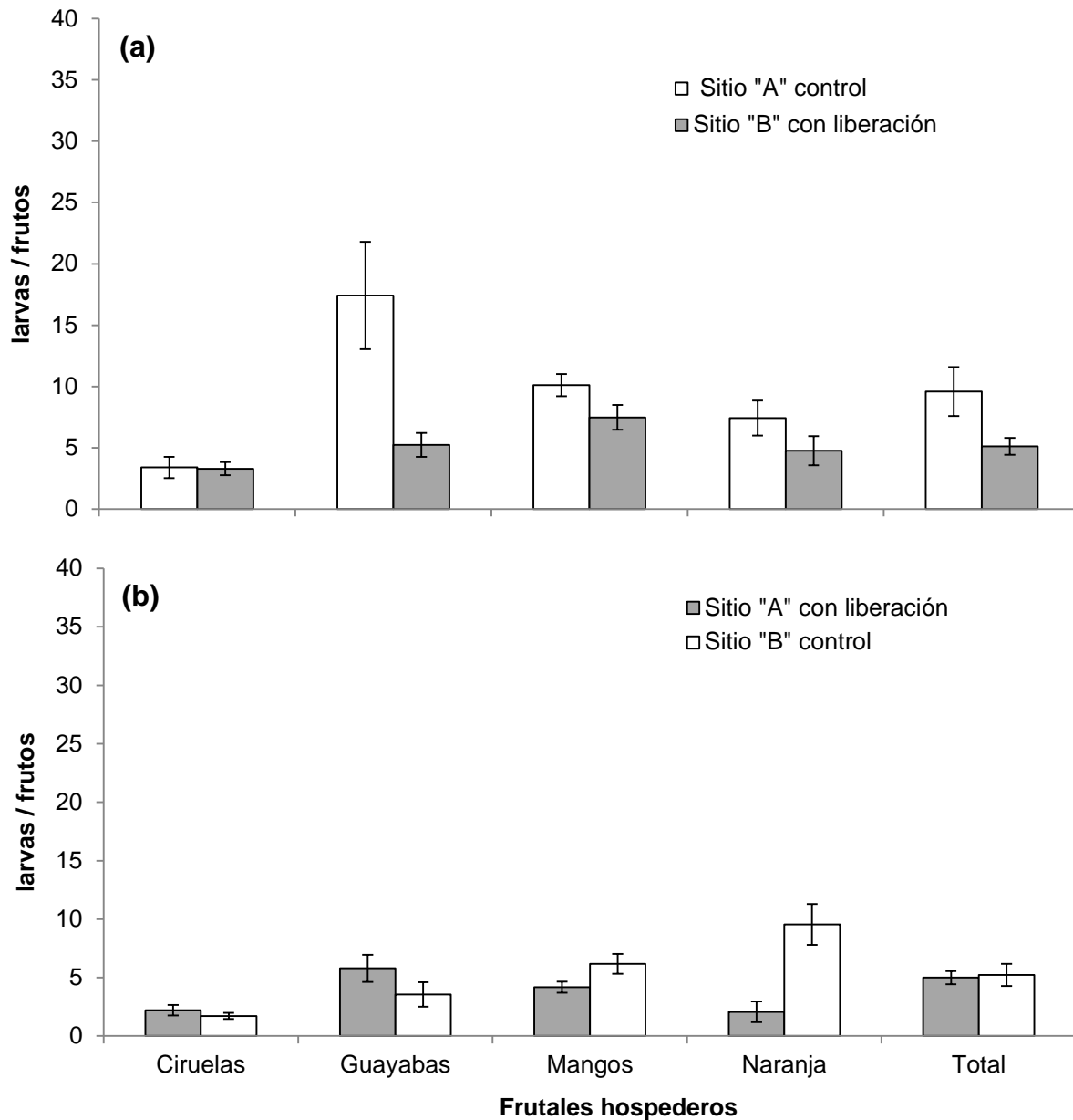


Figura 2. Promedio (\pm EE) de larvas de *Anastrepha* spp. por fruto en cada hospedero con liberación *D. longicaudata* y control. (a) Ciclo 2013-14. (b) Ciclo 2014-15.

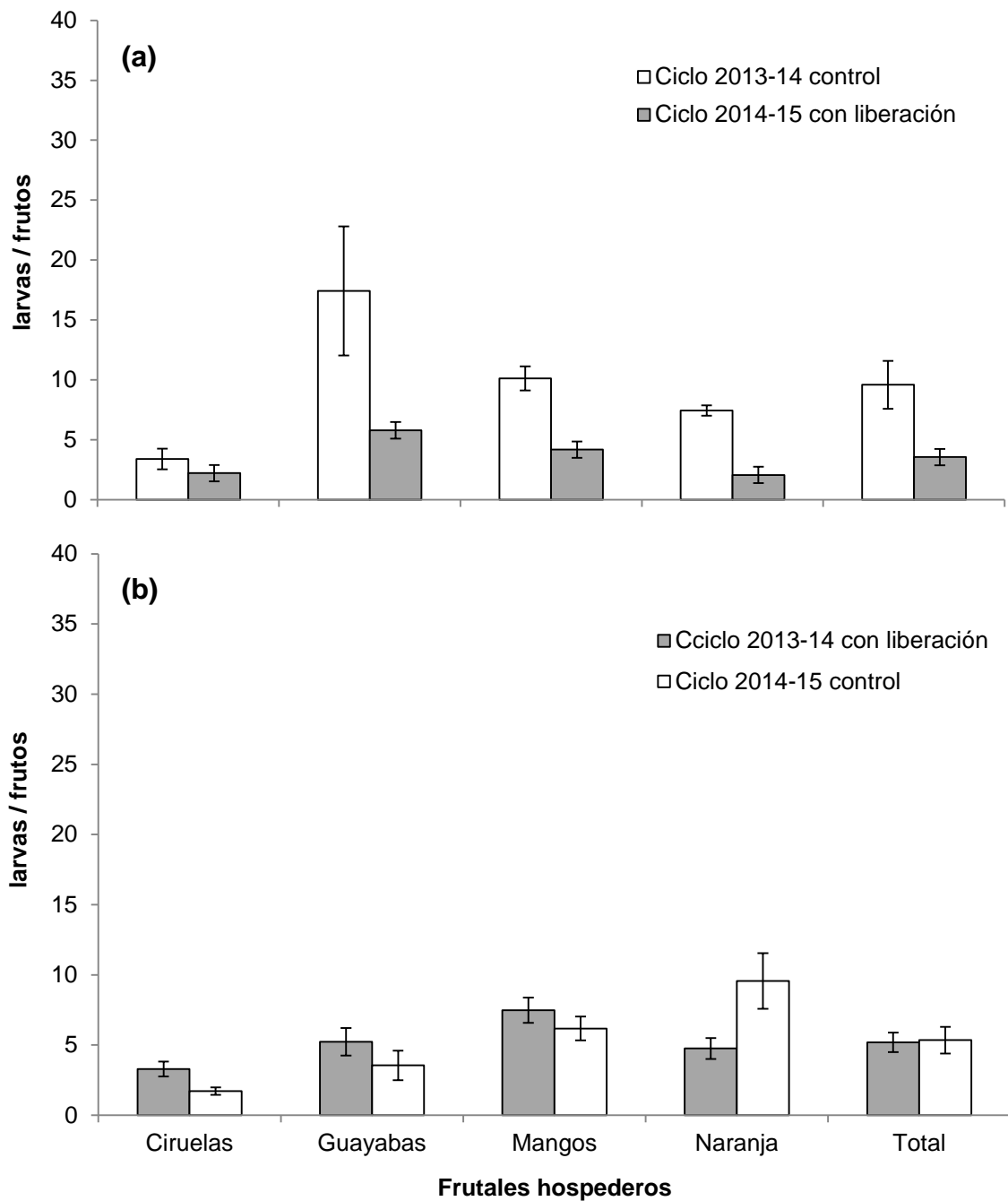


Figura 3. Promedio (\pm EE) de larvas de *Anastrepha* spp. por fruto en cada hospederos en los ciclos con liberación de *D. longicaudata* y control. (a) Sitio A. (b) Sitio B.

3.3. Captura de adultos

El 97% de las moscas capturados fueron *A. obliqua*. El número de adultos capturados en las trampas no fue afectado significativamente por las liberaciones de parasitoides. Sin embargo, se pudo observar que en el ciclo 2013-14 los valores más bajos se registraron en el sitio con liberación. En el ciclo 2014-15 el número de capturas disminuyó significativamente ($P= 0.001$), tanto para el sitio con liberación como para el control (Figura 4).

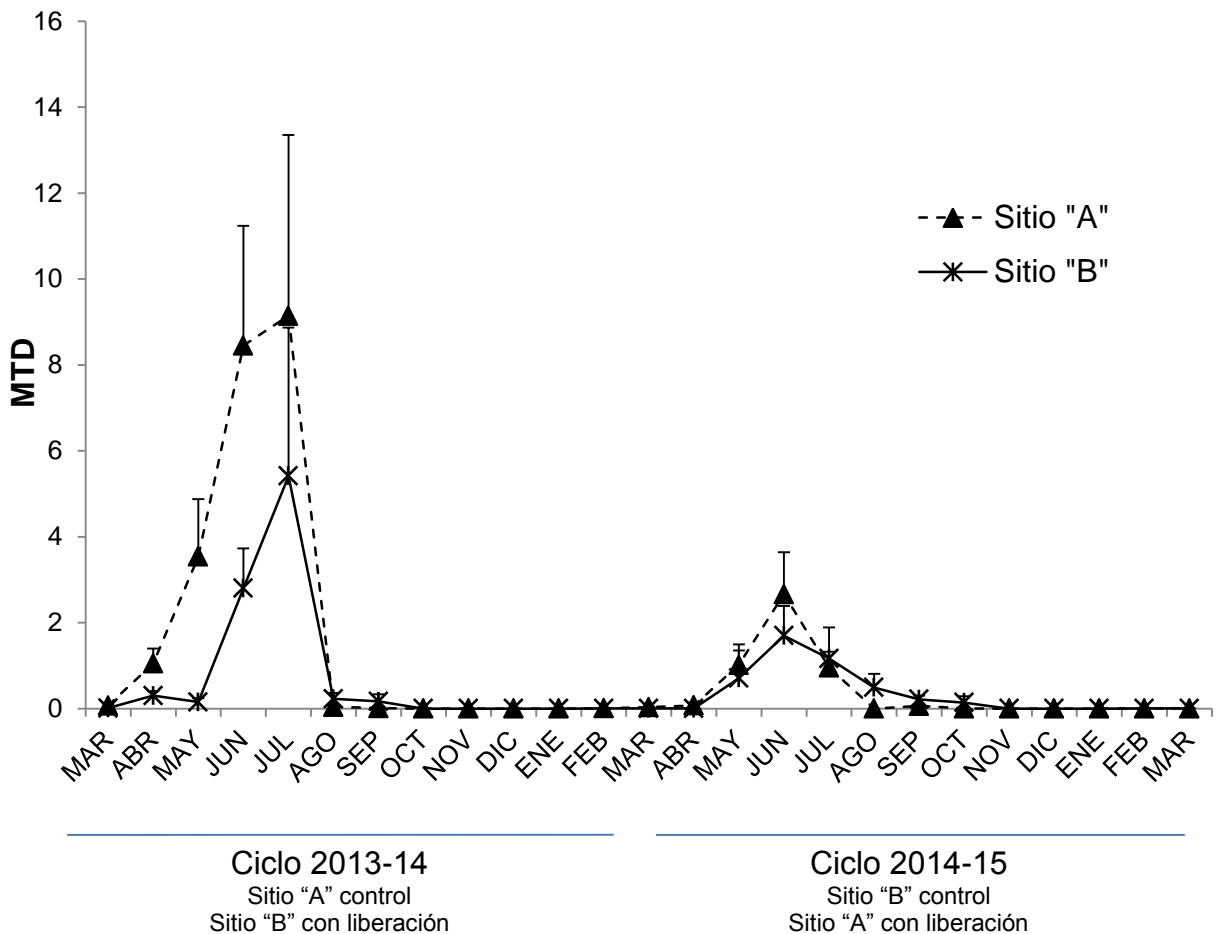


Figura 4. Moscas/trampas/días (MTD) de *A. obliqua* por mes en los sitios "A" y "B" en cada ciclo con liberaciones de *D. longicaudata* y control.

3.4. Parasitismo

El parasitismo total de *D. longicaudata* en ciclos de liberación fue de 5.9 y 20.2%, mientras que en los ciclos que sirvieron como control fue de cero y 6.8% en el sitio “A” y “B” respectivamente (Cuadro 2). Para la especie nativa *D. areolatus* su parasitismo total fue similar en ambos sitios con liberación y control (Cuadro 2). El parasitismo total, adicionando las dos especies de parasitoides, incrementó de 15.5 y 25.9% en el ciclo control a 22.0 y 33.9% en el ciclo con liberación en el sitio “A” y “B” respectivamente. El parasitismo total de *D. longicaudata* fue mayor en las especies de frutales exóticas como la naranja agria (9.1 y 16.7%, sitio “A” y “B” respectivamente) y el mango (13.6 y 39.5%, sitio “A” y “B” respectivamente) y menor en las especies nativas *Spondias* (Cuadro 2). En el caso de la especie nativa *D. areolatus* sucedió lo contrario, el mayor porcentaje de parasitismo se observó en las *Spondias* (de 29.3 a 36.2%) y sin parasitismo en mangos ni en naranjas (Cuadro 2). La guayaba fue compartida por las dos especies de parasitoides, siendo *D. longicaudata* el de mayor porcentaje de parasitismo (8.6 y 29.1%, sitio “A” y “B”, respectivamente) (Cuadro 2).

Al comparar el parasitismo entre sitios en el mismo ciclo (Figura 5 y 6), en el primer ciclo (Figura 5) se registró un incremento significativo de 32.3% en guayabas ($t_{2.8}$; $P = 0.0139$), 39.5% en mango ($t_{4.8}$; $P = 0.001$), 16.7% en naranja ($t_{4.8}$; $P = 0.001$) y 22.9% en el total ($t_{4.6}$; $P = 0.001$); en el segundo ciclo (Figura 6) solo se registró un incremento significativo de 13.5% en mango ($t_{4.4}$; $P = 0.0003$). Al comparar el parasitismo entre ciclos en la mismo sitio, el sitio “A” registró un incremento significativo de 13.5% en mango ($t_{4.5}$; $P = 0.0001$) y 9.1% en naranja ($t_{4.5}$; $P = 0.0001$); en el sitio “B” un incremento significativo de 17.1% en guayaba ($t_{2.8}$; $P = 0.0237$), 39.5% en mango ($t_{4.5}$; $P = 0.0001$) y 14.9% en el total ($t_{2.5}$; $P = 0.0342$). El parasitismo de *D. areolatus* no registró diferencias significativas al comparar entre sitios y ciclos con liberación de *D. longicaudata* y control.

4. Discusión

Las diferencias en el parasitismo de *D. longicaudata* y *D. areolatus* son evidentes cuando se comparan los frutos hospederos, resaltando el efecto de éstos sobre la

coexistencia de éstas especies. La especie nativa *D. areolatus* predominó sobre los frutos nativos de *Spondias*; esta dominancia no se vio afectada por el ciclo de estudio ni por la zona de liberación de *D. longicaudata*, la cual predominó sobre las especies frutales exóticas de mango y naranja, permitiendo así una repartición de los recursos disponibles. En guayaba, que también es un hospedero nativo, se registraron las dos especies de parasitoides, lo cual permitió incrementar el parasitismo total. La acción ejercida por la adición de las dos especies de parasitoides indicó que las liberaciones de *D. longicaudata* pueden complementar el parasitismo natural ejercido por *D. areolatus*. Esta observación indica que los parasitoides liberados no desplazaron a los nativos.

Con las liberaciones de *D. longicaudata* se observó una reducción del número de larvas por fruto al comparar entre sitios (en el ciclo 2013-14) y entre ciclos (en el sitio "A"). En el control (ciclo 2014-15), los niveles de parasitismo por *D. longicaudata* en ciruela, guayaba y naranja sugieren un efecto residual de estas liberaciones.

El tamaño de la fruta se ha considerado como un factor importante en las tasas de parasitación (Sivinski et al. 1997; López et al. 1999) y más recientemente como un factor relacionado con la separación de nichos dentro de la competencia interespecífica (Sivinski et al. 1997, Aluja et al. 2013). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *D. areolatus* puede parasitar individuos de etapas más tempranas, larvas recién eclosionadas e incluso huevos (Murillo et al. 2015), los cuales independientemente del tamaño de la fruta estarán cerca de la parte superficial del fruto. Por lo tanto es más probable que la coexistencia de *D. longicaudata* y *D. areolatus* dependa del grado de afinidad de *D. areolatus* por *A. obliqua* en las *Spondias* y la capacidad de *D. longicaudata* de aprovechar el recurso libre que deja *D. areolatus*, ya que si *D. longicaudata* parasita a *A. obliqua* en *Spondias* invariablemente atacará estadios larvales maduros los cuales tendrán una alta probabilidad de haber sido parasitados por *D. areolatus* (Murillo et al. 2015), lo cual conllevaría a una competencia intrínseca que puede ser evitada por *D. longicaudata* al ocupar los espacios libres de *D. areolatus*.

Cuadro 2. Abundancia y parasitismo total de *D. areolatus*, *D. longicaudata* en cada hospedero frutal en ciclos con liberaciones de *D. longicaudata* y control.

Hospederos	Ciclo 2013-14					Ciclo 2014-15				
	Sitio "A" control					Sitio "A" con liberación				
	Da	DI	A	PDa	PDI	Da	DI	A	PDa	PDI
Ciruela roja (<i>S. purpurea</i>)	2	0	32	5.9	0.0	1	0	3	25.0	0.0
Ciruela jobo (<i>S. mombin</i>)	51	0	79	39.2	0.0	16	0	16	50.0	0.0
Ciruela cundoria (<i>S. dioica</i>)	12	0	21	36.4	0.0	17	2	58	22.1	2.6
Ciruela criolla (<i>Spondias</i> sp.)	1	0	4	20.0	0.0	2	1	7	20.0	10.0
Ciruelas (<i>Spondias</i> spp.)	66	0	136	32.7	0.0	36	3	84	29.3	2.4
Guayaba criolla	9	0	115	7.3	0.0	1	0	17	5.6	0.0
Guayaba pera	3	0	128	2.3	0.0	1	5	32	2.6	13.2
Guayaba rosa	0	0	3	0.0	0.0	0	0	2	0.0	0.0
Guayabas (<i>Psidium guajava</i>)	12	0	246	4.7	0.0	2	5	51	3.4	8.6
Mango criollo	0	0	42	0.0	0.0	0	3	16	0.0	15.8
Mango Tommy	0	0	1	0.0	0.0	0	0	3	0.0	0.0
Mango Oro	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
Mangos (<i>Mangifera indica</i>)	0	0	43	0.0	0.0	0	3	19	0.0	13.6
Naranja agria (<i>C. aurantium</i>)	0	0	5	0.0	0.0	0	3	30	0.0	9.1
Naranja dulce (<i>C. sinensis</i>)	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
Naranjas (<i>Citrus</i> spp.)	0	0	5	0.0	0.0	0	3	30	0.0	9.1
Total	78	0	425	15.5	0.0	38	14	184	16.1	5.9
	Sitio "B" con liberación					Sitio "B" control				
Ciruela roja (<i>S. purpurea</i>)	1	0	9	10.0	0.0	2	0	11	15.4	0.0
Ciruela jobo (<i>S. mombin</i>)	64	3	54	52.9	2.5	44	4	79	34.6	3.1
Ciruela cundoria (<i>S. dioica</i>)	37	3	106	25.3	2.1	10	2	10	45.5	9.1
Ciruela criolla (<i>Spondias</i> sp.)	0	0	5	0.0	0.0	1	0	3	25.0	0.0
Ciruelas (<i>Spondias</i> spp.)	102	6	174	36.2	2.1	57	6	103	34.3	3.6
Guayaba criolla	21	57	141	9.6	26.0	7	0	34	17.1	0.0
Guayaba pera	0	20	25	0.0	44.4	0	4	10	0.0	28.6
Guayaba rosa	0	0	1	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
Guayabas (<i>Psidium guajava</i>)	21	77	167	7.9	29.1	7	4	44	12.7	7.3
Mango criollo	0	43	69	0.0	38.4	0	0	0	0.0	0.0
Mango Tommy	0	15	20	0.0	42.9	0	0	0	0.0	0.0
Mango Oro	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	0	58	89	0.0	39.5	0	0	0	0.0	0.0
Naranja agria (<i>C. aurantium</i>)	0	2	10	0.0	16.7	0	13	101	0.0	11.4
Naranja dulce (<i>C. sinensis</i>)	0	0	0	0.0	0.0	0	0	0	0.0	0.0
Naranjas (<i>Citrus</i> spp.)	0	2	10	0.0	16.7	0	13	101	0.0	11.4
Total	123	143	440	17.4	20.2	64	23	248	19.1	6.8

Da=*D. areolatus*, DI= *D. longicaudata*, A= Adultos de *Anastrepha*, PDa= Parasitismo de *D. areolatus* y PDI= Parasitismo de *D. longicaudata*.

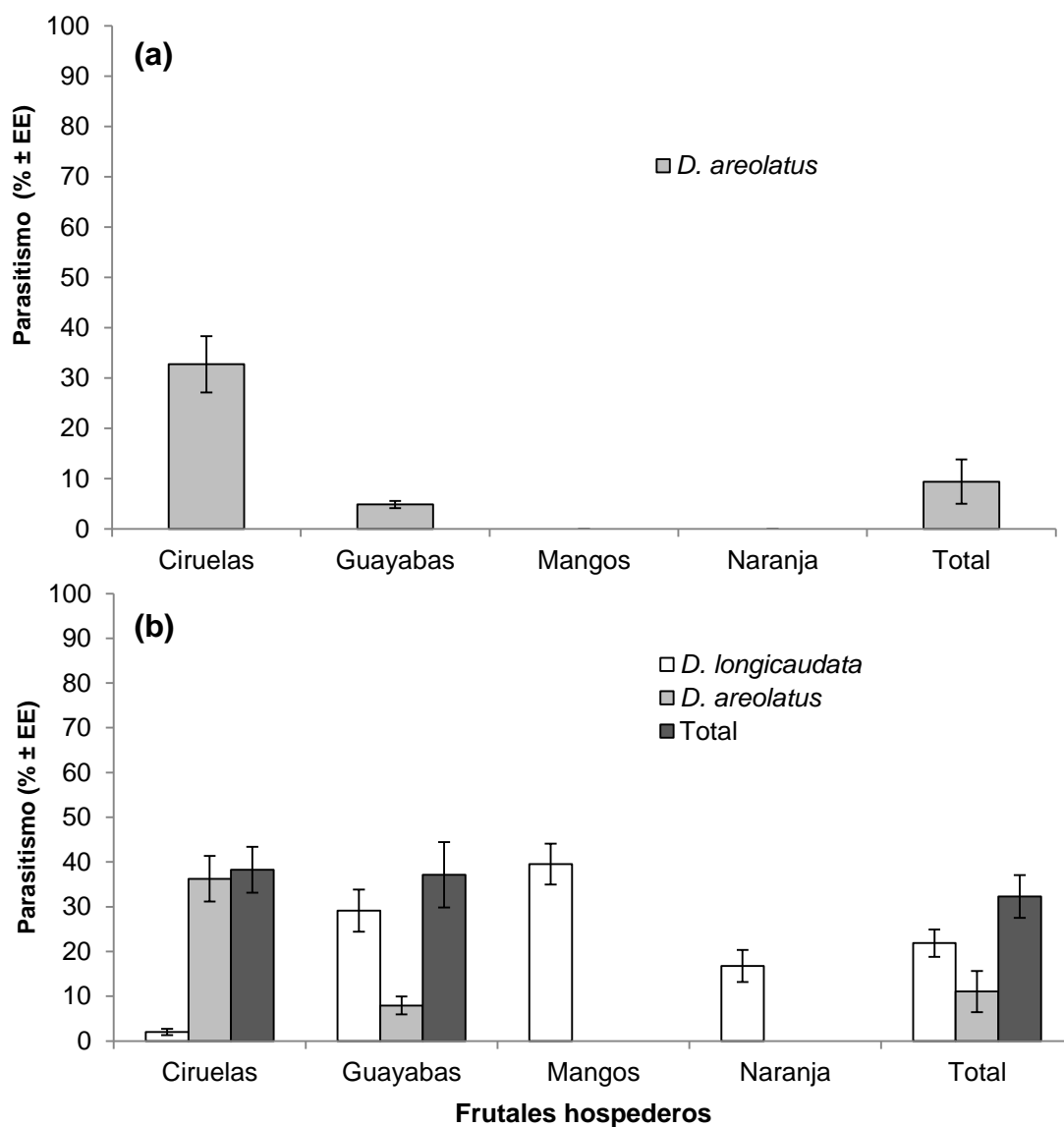


Figura 5. Promedio (\pm EE) del parasitismo de *D. longicaudata*, *D. areolatus* y total sobre *Anastrepha* spp. en hospedero frutal en la sitio "A" control (a) y sitio "B" con liberación de *D. longicaudata* (b) en el ciclo 2013-14.

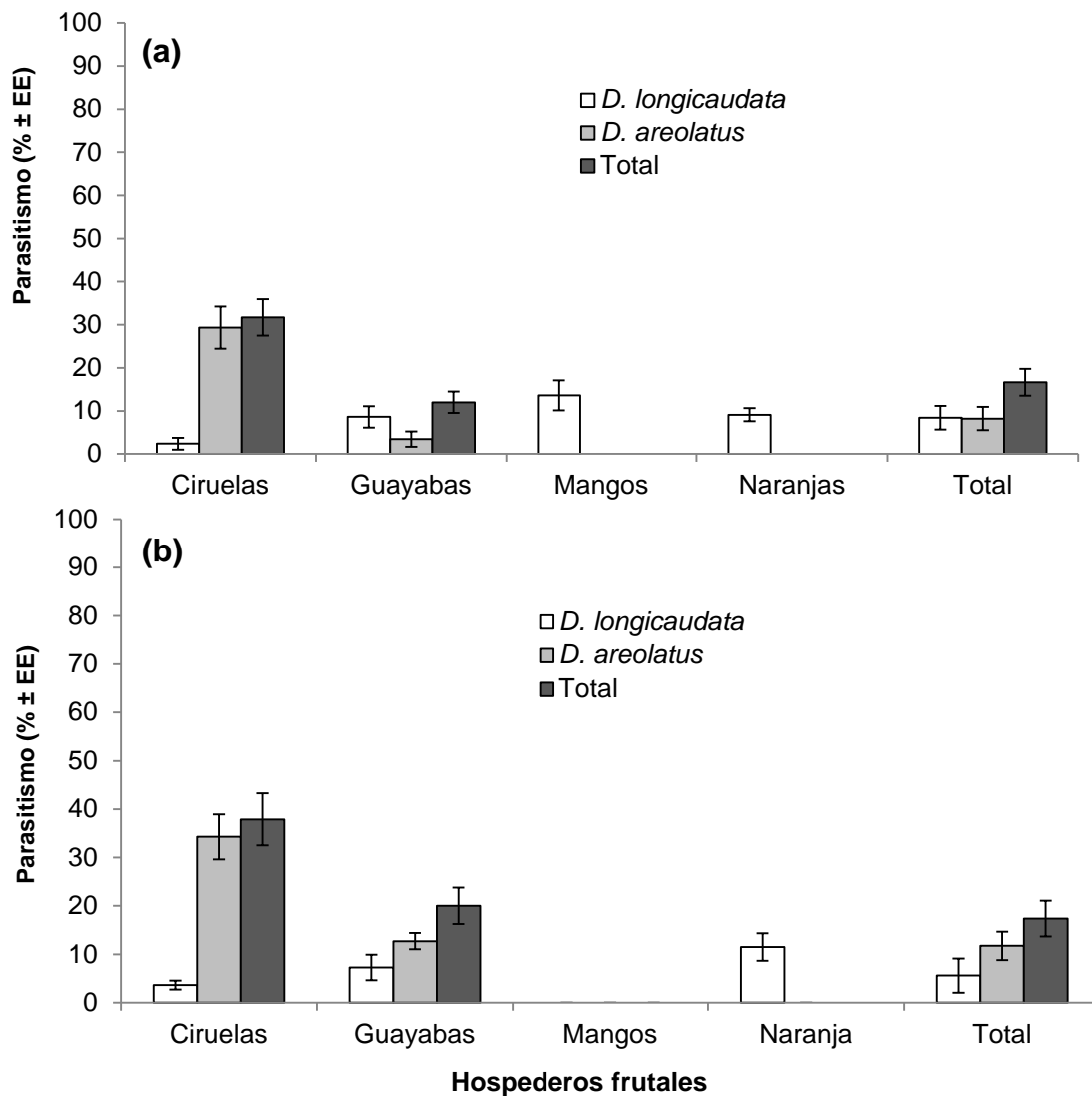


Figura 6. Promedio (\pm EE) del parasitismo de *D. areolatus*, *D. longicaudata* y total sobre *Anastrepha* spp. en cada hospedero frutal en el sitio "A" con liberación de *D. longicaudata* (a) y sitio "B" control (b) en el ciclo 2014-15.

Los niveles de parasitismo reportados en este estudio podrían estar subestimando el efecto real de las liberaciones de parasitoides. La colecta de fruta descarta las larvas que contienen una exposición posterior a parasitoides, lo que conlleva solo a una estimación del parasitismo potencial (Sivinski et al. 1996b). Esto es un problema particular en la estimación del parasitismo por *D. longicaudata*, ya que éste parasitoide

forrajea extensivamente sobre fruta caída y en fase de descomposición avanzada (Purcell et al. 1998). Wong et al. (1991) han señalado que el muestreo de fruta puede causar una reducción considerable en la densidad de las larvas de mosca que podrían haber estado disponible para los parasitoides.

No obstante, el parasitismo total de *D. longicaudata* en frutos de mangos y naranjas fue importante y contribuyó en el parasitismo de guayaba y total. *D. areolatus* no parasitó larvas en mango ni en naranja a pesar de la disponibilidad de larvas, las cuales fueron aprovechadas por *D. longicaudata* contribuyendo a un incremento del parasitismo total de 41.1%. Al darse esta repartición de larvas en diferentes hospederos, las liberaciones de *D. longicaudata* complementaron el parasitismo natural ejercido por *D. areolatus*, lo cual fue más evidente en guayaba (74.1% de incremento), incrementando el parasitismo total de 5.5 a 15.7%.

D. longicaudata dio pruebas de establecimiento cuando se recuperó un año después de las liberaciones. *D. longicaudata* se ha establecido exitosamente en algunas regiones agroecológicas de México, donde ha logrado importantes niveles de parasitismo y mantener sus poblaciones en el tiempo (Aluja et al. 1990; López et al. 1999; Sivinski et al. 2000). En Veracruz es abundante en algunas regiones de montaña del centro del estado (Sivinski et al. 2000), lo que sugiere que esta especie tiene probabilidades de establecerse en la región de estudio e incrementar sus poblaciones en los hospederos como mangos y naranjas, lo cual contribuirá al incremento del parasitismo natural de *Anastrepha* spp. en la región.

En algunas regiones del centro de Veracruz *D. longicaudata* es más abundante que *D. areolatus* a mayor altitud y en frutos grandes (López et al. 1999; Sivinski et al. 2000). No está claro si las distribuciones altitudinales son el resultado de la competencia interespecífica que conduce a la subdivisión del hábitat, pero en nuestro caso, la región de estudio tiene una altitud baja y no hay evidencia de un posible desplazamiento de especies en los sitios donde se liberó *D. longicaudata* y donde *D. areolatus* era ya residente. Bajo las condiciones de nuestra región de estudio, la separación de nichos estuvo dada por las especies de frutos hospederos, ya que el mayor impacto de las liberaciones de *D. longicaudata* se observó en especies exóticas como mangos y naranjas, las cuales no son aprovechados por el parasitoide nativo

residente *D. areolatus*, el cual actúa casi exclusivamente sobre larvas de *A. obliqua* en frutos de *Spondias* spp.

En un estudio previo (ciclo 2012-2013) sobre el parasitismo natural en la región de nuestro estudio (Montoya et al. Sometido) se demostró que la especie *D. longicaudata* no estaba presente en la región y que la especie *D. areolatus* parasitó casi exclusivamente en las especies de frutales *Spondias* ($\approx 30\%$), resultados muy similares a lo reportado en nuestro estudio en condiciones de liberación de *D. longicaudata*, lo que sugiere la baja probabilidad del desplazamiento de la especie nativa.

La abundancia de hospederos de moscas de la fruta en los alrededores de huertos es un factor clave para determinar la eficiencia de los programas de liberación de parasitoides (Aluja y Liedo 1986). En nuestra región de estudio los hospederos se encuentran en áreas silvestres, de traspatio y sin manejo agrícola, los cuales son fuentes importantes de refugio y reproducción de moscas que se trasladan a los huertos donde pueden causar graves daños. Por lo tanto, consideramos que los programas de control biológico por aumento deben estar orientados a la supresión de poblaciones de moscas en estas zonas de origen (Aluja et al., 1996; Sivinski et al. 1996a; Montoya et al. 2000a). Hay dos formas en que los parasitoides pueden reducir las poblaciones de moscas, reduciendo el número actual de larvas en frutos infestados, o si los niveles de infestación permanecen altos, reduciendo el número de moscas adultas (Sivinski et al., 1996). En nuestro caso, el efecto del CBA se puede relacionar con la reducción del número de larvas por fruto de moscas *Anastrepha* en las áreas de liberación, ya que la infestación (I/f) en el sitio y ciclo en que por primera vez se realizaron las liberaciones de *D. longicaudata* fue significativamente menor al control correspondiente.

El efecto de las liberaciones en el número de moscas adultas conlleva la dificultad del completo aislamiento de fuentes externas de moscas, ya que estas pueden migrar al sitio de liberación y enmascarar el efecto de las liberaciones, como fue el caso con *D. longicaudata* en Florida, EU y México (Sivinski et al. 1996; Montoya et al. 2000a). En nuestro caso, consideramos que el número de moscas capturadas pudo ser afectado por una falta de aislamiento de la población en las zonas experimentales y una posible influencia de condiciones climáticas predominantes en cada ciclo de estudio, ya que las

poblaciones de moscas en los sitios con liberación de *D. longicaudata* y control se comportaron de manera similar en cada uno de los ciclos (Figura 4).

Con base en nuestros resultados, consideramos que el control biológico aumentativo de moscas de la fruta puede ser utilizado contra poblaciones aisladas, donde podría añadir el parasitismo como un efecto aditivo significativo en la supresión de poblaciones de la plaga.

Agradecimientos

A Jorge Cancino y Patricia López (Lab. Control Biológico, Programa MOSCAFRUT, SENASICA-SAGARPA), por su asistencia técnica. Al Programa Mosca de la Fruta de la Dirección General de Sanidad Vegetal (SENASICA-SAGARPA), por el material biológico proporcionado. A Jasmine, Ana Lili, Gerardo, Guillermo y Gilberto, por su apoyo en campo. Este estudio recibió financiamiento a través del Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT Proyecto No. 163431. Se agradece al CONACYT por la beca otorgada a Félix D. Murillo para sus estudios de Doctorado.

Literatura citada

- Aluja M, Ovruski SM, Sivinski J, Córdova-García G, Schliserman P, Núñez-Campero SR, Ordano M (2013) Inter-specific competition and competition-free space in the tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecological Entomology* 38: 485–496
- Aluja M, Celedonio-Hurtado H, Liedo P, Cabrera M, Castillo F, Guillén, J, Ríos E (1996) Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 89: 654–667
- Aluja M, Guillen J, Liedo P, Cabrera M, Ríos E, De la Rosa G, Celedonio H, Mota D (1990) Fruit infesting Tephritids [Dip.: Tephritidae] and associated parasitoids in Chiapas, Mexico. *Entomophaga* 35: 39-48

- Aluja M, Liedo, P (1986) Perspectives on future integrated management of fruit flies in Mexico. In: "Pest Control: Operations and Systems Analysis in Fruit Fly Management" (Mangel M, Carey JR, Plant RE. Eds.), pp. 9–42. Springer-Verlag, Berlin.
- Baranowsky RM, Gleen H, Sivinski, J (1993) Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 76, 245–250
- Burns ED., Diaz J, Holler TC (1996) Inundative release of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* for the control of the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa* (Loew). In "Fruit Fly Pests. A World Assessment of Their Biology and Management" (McPheron BA, Steck GF Eds.), St. Lucie Press, Delray Beach, FL. pp. 377–381
- Camacho H (1994) The integrated use of the sterile flies and parasitoids in fruit fly control in Costa Rica. In "Fourth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Sand Key, Florida."
- Cancino J, Ruiz L, López P, Moreno FM (2010) Cría Masiva de Parasitoides. Montoya P, Toledo J y Hernández E (eds.), Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo. S y G editores, México, D.F. pp. 291-306.
- Eskafi FM (1990) Parasitism of fruit flies *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Guatemala. *Entomophaga* 35, 355–362
- González PI, Montoya P, Pérez-Lachaud G, Cancino J, Liedo P (2010) Host discrimination and superparasitism in wild and mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Hym.: Braconidae) females. *Biocontrol Science and Technology*, Vol. 20, No. 2, 137-148
- González PI, Montoya P, Pérez-Lachaud G, Cancino J, Liedo P (2007) Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 40 (3): 320-326
- Jirón LF, Mexzon RG (1989) Parasitoid hymenopterans of Costa Rica: Geographical distribution of the species associated with fruit flies. *Entomophaga* 34, 53-60
- Knipling FE (1992) "Principles of Insect Parasitism Analyzed from New Perspectives." *Agriculture Handbook* 693, USDA, ARS. pp. 1–159

- López M, Aluja M, Sivinski J (1999) Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biological Control* 15, 119–129
- Montoya P, Cancino J, Ruiz L (2012a) Packing of fruit fly parasitoids for augmentative releases. *Insects* 3: 889-899
- Montoya P, Pérez-Lachaud G, Liedo P (2012b) Superparasitism in the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) and the implications for mass rearing and augmentative release. *Insects* 3: 900-911
- Montoya P, Cancino J, Pérez-Lachaud G, Liedo P (2011) Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. *BioControl* 56: 11-17
- Montoya P, Cancino J, Zenil M, Santiago G, Gutierrez JM (2007) The Augmentative Biological Control Component in the Mexican National Campaign Against *Anastrepha* spp. *Fruit Flies* in: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J (eds.), *Area-Wide Control of Insect Pests* 661–670
- Montoya P, Cancino J, Zenil M, Gomez E, Villaseñor A (2005) Parasitoid releases in the control of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) outbreaks, in coffee growing zones of Chiapas, Mexico. *Vedalia* 12: 85-89
- Montoya P, Cancino J (2004) Control biológico por aumento de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) *Folia Entomologica Mexicana* (43) 3: 257-270
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M (2000a) Biological Control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in Mango Orchards through Augmentative Releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 18: 216–224
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Barrera JF, Cancino J, Aluja M (2000b) Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93(1): 47-54
- Murillo FD, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Liedo P, Montoya P (2015) *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of

- Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). Journal of Hymenoptera Research 46: 91–105
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R (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. Integrated Pest Management Reviews 5: 81–107
- Purcell, MF (1998) Contribution of biological control to integrated pest management of tephritid fruit flies in the tropics and subtropics. Integrated Pest Management Reviews 3: 1-21.
- SAS Institute (2008) SAS 9.4 online documentation. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SAGARPA-SENASICA (2012) Dirección de moscas de la fruta. Manual técnico para las operaciones de campo de la campaña nacional contra moscas de la fruta sección IV Control Biológico. México. pp. 4-9
- Sivinski JM, Piñero J, Aluja M (2000) The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. Biological Control 18: 258-269
- Sivinski J, Aluja M, López M (1997) Spatial and Temporal Distributions of Parasitoids of the Mexican *Anastrepha* Species (Diptera: Tephritidae) Within the Canopies of Fruit Trees. Annals of the Entomological Society of America 90: 604-618
- Sivinski JM (1996a) The past and potential of biological control of fruit flies. In “Fruit Fly Pests. A World Assesment of Their Biology and Management” (B. A. McPheron, and G. F. Steck, Eds.). St. Lucie Press. Delray Beach, FL. pp. 369–375
- Sivinski J, Calkins CO, Baranowski R, Harris D, Brambila J, Diaz J, Burns R, Holler T, Dobson G (1996b) Suppression of a Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) population through augmentative releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Biological Control 6: 177-185
- SMN (2010) National Meteorological Service (Servicio Meteorológico Nacional). Normal values (1971-2000) for Medellín de Bravo, Veracruz (Valores normales de 1971-2000 para Medellín de Bravo, Veracruz). [On line] available: <http://smn.cna.gob.mx/> [Accessed 22 October 2014]

- Wharton RA, Gilstrap FE, Rhode RH, Fische M, Hart WH (1981) Hymenopterous egg-pupal and larval-pupal parasitoids of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Dipt.: Tephritidae) in Costa Rica. *Entomophaga* 26: 285–290
- Wharton RA, Marsh PM (1978) New world Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitic on Tephritidae (Diptera). *Journal Washington Academy of Sciences* 68: 17–167
- Wong TTY, Mochizuki N, Nishimoto JI (1984) Seasonal abundance of parasitoids of the Mediterranean and Oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) in the Kula Area of Maui, Hawaii. *Environmental Entomology* 13: 140–145
- Wong TTY, Ramadan MM, McInnis DO, Mochizuki N, Nishimoto JJ, Herr JC (1991) Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. *Biological Control* 1: 2–7

CONCLUSIONES FINALES

La competencia interespecífica asociada al control biológico por aumento de moscas del género *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no ocasiona un efecto negativo sobre las especies nativas, ya que la competencia interespecífica generada por el control biológico por aumento es compensada en diferentes formas, tanto intrínseca como extrínsecamente, lo cual permite que no haya un impacto sobre las poblaciones de parasitoides nativos y además pueda darse un efecto complementario sobre el parasitismo natural de *Anastrepha* spp.

Los atributos intrínsecos de *D. longicaudata* han sido los más estudiados en laboratorio (Montoya, et al., 2000b; 2011; González, et al., 2010). Los atributos como su fertilidad, fecundidad, superparasitismo, capacidad de discriminación de conoespecíficos y la segregación de compuestos tóxicos para la competencia intrínseca (competencia de larvas de parasitoides dentro de la larva de *Anastrepha*), probablemente sean los que hacen a *D. longicaudata* un competidor con mayor vigor en relación a otros parasitoides. Sin embargo, esta ventaja puede ser compensada por las especies nativas al ser residentes, ya que se ha demostrado experimentalmente que en competencia intrínseca interespecífica la especie residente es menos afectada, lo que permitiría un menor efecto de la competencia por *D. longicaudata*. Las adaptaciones morfológicas de las larvas de primer instar de los parasitoides son otra forma de compensar la superioridad intrínseca de *D. longicaudata*, ya que la larva de la especie nativa *U. anastrephae* posee un cuerpo y mandíbulas grandes, lóbulos maxilares en forma de colmillos y un apéndice caudal que la hacen tener mayor fuerza, ataque, defensa y movilidad para competir con la larva de primer instar de *D. longicaudata*, esto le permite resistir mejor la competencia intrínseca de *D. longicaudata* que cualquier otra larva de especie nativa. La biología de las especies también puede tener un efecto importante en la competencia intrínseca, si es que esta tiende a desarrollarse hacia la compensación de la competencia, lo cual puede llegar a ser un factor clave para la dominancia de la especie. El hallazgo de la acción temprana del parasitoide nativo *D. areolatus*, que tiene la capacidad de parasitar embriones de larvas en el interior de huevos y larvas recién eclosionadas de *A. obliqua* (Murillo, et al., 2015), le puede brindar una ventaja competitiva contra *D. longicaudata*, pues estas especies

invariablemente atacarán estadios larvales maduros que tendrían una alta probabilidad de haber sido parasitados por *D. areolatus*, que aunque se ha comprobado que *D. longicaudata* es capaz de aniquilar a las larvas de *D. areolatus*, es probable que *D. longicaudata* prefiera evitar la competencia o el riesgo de que sus huevos o larvas recién eclosionadas mueran por efecto directo o indirecto de una larva de primer instar bien desarrollada de *D. areolatus*, de tal forma que es probable que *D. longicaudata* busque larvas no parasitadas por *D. areolatus* o discrimine en cierto grado, aprovechando únicamente las larvas no ocupadas por el residente.

El parasitoide *D. longicaudata* tiene una mayor especificidad que otros parasitoides, una gran adaptabilidad a diversas condiciones climáticas, una respuesta funcional denso-dependiente, una capacidad de búsqueda y orientación que le permiten localizar a su huésped en diferentes circunstancias, y una capacidad de discriminación que lo continúan posicionando como una especie de primera elección para programas de control biológico por aumento (Montoya y Cancino, 2004). Sin embargo, estos atributos por sí solo no representan la expresión sobresaliente de cada uno, ya que solo la buena combinación de estos y las interacciones con el medio ambiente, expresaran el papel competitivo de esta especie y sus efectos en el ambiente. De tal forma que la competencia con especies como *D. crawfordi* y *O. hirtus*, que son competidores intrínsecos inferiores a *D. longicaudata*, puede compensarse con las condiciones ambientales o especies de frutos hospederos, ya que *D. longicaudata* está más adaptado a los ambientes bajos y secos con una gran diversidad de hospederos frutales y especies de moscas, mientras que *D. crawfordi* forrajea mejor en ambientes de zonas altas, frescas y húmedas que pueden contener árboles silvestres de cítricos (Sivinski, et al., 2000). La competencia con *O. hirtus* puede compensarse por la especialización de esta especie sobre especies raras de hospederos como *A. cordata* y *A. alveata*, que a su vez atacan hospederos frutales poco comunes (Hernández-Ortiz, et al., 1994; López, et al., 1999; Sivinski, et al., 2000; Aluja, et al., 2003), los cuales probablemente no son atractivos para *D. longicaudata*. En el caso de *D. areolatus* y *U. anastrephae* la competencia extrínseca con *D. longicaudata* es compensada a través del profundo grado de afinidad de *D. areolatus* y *U. anastrephae* por *A. obliqua* en las *Spondias* y la capacidad de *D. longicaudata* de aprovechar todo el recurso libre por

estas especies nativas al no parasitar larvas en frutos exóticos como mangos, naranjas y toronjas, lo cual permite una separación de nichos y una competencia compensada que da lugar a que el parasitismo por las especies nativas sea complementado e incrementado con el parasitismo inducido a través de las liberaciones de *D. longicaudata*.

Se considera que el control biológico por aumento con *D. longicaudata* dirigido a hospederos exóticos como mango y cítricos, en poblaciones aisladas, o por lo menos en grandes áreas, puede ser muy eficaz y aceptable ambientalmente. Además, si este tipo de control biológico se utiliza en combinación con el parasitismo natural podría resultar un efecto sinérgico en la supresión de poblaciones de la plaga.

Se recomienda ampliar los estudios de cría y liberación de especies de parasitoides nativos como *U. anastrephae* y *D. areolatus* con el fin de utilizarlos en liberaciones para aumentar el parasitismo natural en las especies de hospederos nativos *Spondias*, las cuales son proveedores importantes de moscas *A. obliqua* que causan graves daños en el cultivo de mango cv. Manila, el cual tiene un valor comercial importante para México.

LITERATURA CITADA

- Aluja M, Ovruski SM, Sivinski J, Córdova-García G, Schliserman P, Núñez-Campero SR, Ordano M. 2013. Inter-specific competition and competition-free space in the tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecological Entomology* 38: 485–496.
- Aluja M, Mangan RL. 2008. Host status determination for pestiferous fruit fly (Diptera: Tephritidae) species: conceptual, methodological and regulatory considerations. *Annual Review of Entomology* 53: 473-502.
- Aluja M, Rull J, Sivinski J, Norrbom AL, Wharton RA, Macías-Ordóñez R, Díaz-Fleischer F, López M. 2003. Fruit Flies of the Genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) and Associated Native Parasitoids (Hymenoptera) in the Tropical Rainforest Biosphere Reserve of Montes Azules, Chiapas, Mexico. *Environmental Entomology*, 32: 1377-1385.
- Aluja M, Piñero J, Jácome I, Díaz-Fleischer F, Sivinski J. 2000. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini), pp. 375-406. In Aluja M, Norrbom A. (eds.), *Fruit flies (Diptera: Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. CRC, Boca Raton, FL.
- Aluja M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology* 39: 155–78.
- Aluja M, Guillén J, Liedo P, Cabrera M, Ríos E, de la Rosa G, Celedonio H, Mota D. 1990. Fruit infesting tephritids (Diptera: Tephritidae) and associated parasitoids in Chiapas, México. *Entomophaga* 35: 39-48.
- Bernal JS. 2007. Biología, ecología y etología de parasitoides, pp. 61-74. En: Rodríguez-del-Bosque LA y Arredondo-Bernal HC (eds.). *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
- Bess HA, Van den Bosch R, Haramoto F. 1961. Fruit fly parasites and their activities in Hawaii. *Proceedings of the Hawaiian Entomology Society* 17: 367-378.
- De Bach PD, Rosen D. 1991. *Biological Control by Natural Enemies*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

- Eitam A, Sivinski J, Holler T, Aluja M. 2004. Biogeography of braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Florida. *Annals of the Entomological Society of America* 97: 928–939.
- Fisher R. 1961. A study in insect mutiparasitism II. The mechanism and control of competition for possession of the host. *Journal of Experimental Biology* 38: 605-628.
- Follett PA, Neven LG. 2006. Current trends in quarantine entomology. *Annual Review of Entomology* 51:359–85.
- García-Mendel D, Sivinski J, Díaz-Fleischer F, Ramírez-Romero R, Aluja M. 2007. Foraging behavior by six fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) released as single- or multiple-species cohorts in field cages: Influence of fruit location and host density. *Biological Control* 43:12-22.
- Griffiths N y Godfray H. 1988. Local mate competition, sex ratio and clutch size in bethylid wasps. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 22: 211-217.
- Godfray HCJ. 1994. *Parasitoids Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press. N.J., USA.
- González PI, Montoya P, Pérez-Lachaudm G, Cancino J, Liedo P. 2010. Host discrimination and superparasitism in wild and mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Hym.: Braconidae) females. *Biocontrol Science and Technology* 2: 137-148.
- González PI, Montoya P, Pérez-Lachaud G, Cancino J., Liedo P. 2007. Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 40: 320-326.
- Greathead DJ y Waage JK. 1983. *Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries*, The World Bank, Washington.
- Haramoto FH, Bess HA. 1970. Recent studies on the abundance of the oriental and Mediterranean fruit flies and the status of their parasites. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 20: 551–566.

- Hernandez-Ortiz V, Perez-Alonso R, Wharton R. 1994 Native parasitoids associated with the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Entomophaga* 39:171–178.
- Hernández-Ortíz V, Aluja M. 1993. Listado de especies del género Neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia entomológica mexicana* 88: 89-105.
- Hochberg ME, Ives AR. 2000. *Parasitoid Population Biology*. Princeton University Press. N.J., USA.
- Jervis MA, Kidd NAC. 1996. *Insect Natural Enemies Practical Approaches to their Study and Evaluation*. Chapman & Hall. London, U. K.
- Knipling EF. 1992. *Principles of insect parasitism analyzed from new perspectives: practical implications for regulating insect populations by biological means*. U.S. Department of Agriculture Handbook.
- Kroder S, Messing RH. 2010. A new parasitoid from Kenya, *Fopius ceratitivorus*, complements the extant parasitoid guild attacking Mediterranean fruit fly in Hawaii. *Biological Control* 53: 223–229.
- Lewis WJ, van Lenteren JC, Phatak SC, Tumlinson III JH. 1997. A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 12243-12248.
- López M, Aluja M, Sivinski J. 1999. Hymenopterous larval–pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biological Control* 15: 119–129.
- Malavasi A, Zucchi RA. (eds.). 2000. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento Básico e Aplicado*. Holos Editora, Ribeirão Preto, Brazil.
- Mills NJ. 1999. “Interspecific competition in insects”, pp. 355-387. En: *Ecological Entomology* / Huffaker, C.B. y Gutierrez, A.P. (Eds.). Second Edition, Wiley, New York.
- Miranda M, Sivinski J, Rull J, Cicero L, Aluja M. 2015. Niche breadth and interspecific competition between *Doryctobracon crawfordi* and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), native and introduced parasitoids of *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) *Biological Control* 82: 86–95.

- Montoya P, Ruiz L, Pérez-Lachaud G, Cancino J, Liedo P. 2013. Field superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* attacking *Anastrepha* spp. larvae on mango fruits. *Biological Control* 64: 160-165.
- Montoya P, Pérez-Lachaud G, Liedo P. 2012. Superparasitism in the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) and the implications for mass rearing and augmentative release. *Insects* 3: 900-911.
- Montoya P, Cancino J, Pérez-Lachaud G, Liedo P. 2011. Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. *BioControl* 56: 11-17.
- Montoya P, Cancino J, Zenil M, Santiago G, Gutierrez JM. 2007. The Augmentative Biological Control Component in the Mexican National Campaign Against *Anastrepha* spp. *Fruit Flies* in: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J (eds.), *Area-Wide Control of Insect Pests* 661–670.
- Montoya P, Cancino J, Zenil M, Gómez E, Villaseñor A. 2005. Parasitoid releases in the control of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) outbreaks, in coffee growing zones of Chiapas, Mexico. *Vedalia* 12: 85-89.
- Montoya P, Cancino J. 2004. Control biológico por aumento en moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae). *Folia Entomológica Mexicana* 43: 257-270.
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M. 2000a. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 18: 216–224.
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Barrera JF, Cancino J, Aluja M. 2000b. Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93: 47-54.
- Murillo FD, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Liedo P, Montoya P. 2015. *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Journal of Hymenoptera Research* 46: 91–105.


- Ovruski SM, Schliserman P, Aluja M. 2004. Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in Northwestern Argentina. *Biological Control* 29: 43-57.
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R. 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. *Integrated Pest Management Reviews* 5: 81-107.
- Paranhos BJ, Sivinski J, Stuhl C, Holler T, Aluja M. 2013. Intrinsic competition and competitor-free-space influence the coexistence of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of Neotropical Tephritidae (Diptera). *Environmental Entomology* 42: 717-723.
- Price PW, Denno RF, Eubanks MD, Finke DL, Kaplan I. 2011. *Insect Ecology Behavior, Populations and Communities*. First published. Cambridge University Press, New York, USA. pp. 185-188.
- Purcell, MF. 1998. Contribution of biological control to integrated pest management of tephritid fruit flies in the tropics and subtropics. *Integrated Pest Management Reviews* 3: 1-21.
- Quicke DLJ. 1997. *Parasitic Wasps*. Chapman & Hall. London, U.K.
- Salt G. 1961. Competition among insect parasitoids. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 15: 96-119.
- Serra CA, Ferreira M, García S, Santana L, Castillo M, Nolasco C. 2011. Establishment of the West Indian fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoid *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae) in the Dominican Republic. *Florida Entomologist* 94: 809-816.
- Sivinski J, Vulinec K, Aluja M. 2001. Ovipositor length in a guild of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) attacking *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) in southern Mexico. *Annals of the Entomological Society of America* 94: 886–895.

- Sivinski JM, Piñero J, Aluja M. 2000. The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control* 18: 258-269.
- Sivinski J, Aluja M, Holler T, Eitam A. 1998. Phenological comparison of two braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 27: 360-365.
- Sivinski J, Aluja M, López M. 1997. Spatial and temporal distributions of parasitoids of the Mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. *Annals of the Entomological Society of America* 90: 604-618.
- Sivinski J, Calkins CO, Baranowski R, Harris D, Brambila J, Diaz J, Burns R, Holler T, Dobson G. 1996. Suppression of a Caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) population through augmentative releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 6: 177-185.
- Wharton R. 1989. Classical biological control of fruit infesting Tephritidae, pp. 303-313. In *Fruit Flies: their Biology, Natural Enemies and Control*. Robinson S, Hooper G. (eds.). Elsevier. Amsterdam, Holland.
- Wang X, Messing R. 2003. Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. *Biological Control* 27: 251-259.
- Wang XG, Messing RH, Bautista RC. 2003. Competitive superiority of early acting species: a case study of Opiine fruit fly parasitoids. *Biocontrol Science and Technology* 4: 391-402.
- Wong TTY, Ramadan MM, McInnis DO, Mochizuki N, Nishimoto JJ, Herr JC. 1991. Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. *Biological Control* 1: 2-7.
- Wong TTY, Ramadan MM. 1987. Parasitization of the Mediterranean and oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) in the Kula area of Maui, Hawaii. *Journal of Economic Entomology* 80: 77-80.

ANEXOS

JHR 46: 91–105 (2015)
doi: 10.3897/JHR.46.5586
<http://jhr.pensoft.net>

RESEARCH ARTICLE

 JOURNAL OF Hymenoptera RESEARCH
The International Society of Hymenoptera

***Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae)
a parasitoid of early developmental stages of
Anastrepha obliqua (Diptera, Tephritidae)**

Félix D. Murillo¹, Héctor Cabrera-Mireles¹, Juan F. Barrera¹,
Pablo Liedo¹, Pablo Montoya²

¹ El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antiguo Aeropuerto Km 2.5, Tapachula, 30700 Chiapas, Mexico
² Programa Moscafrut SENASICA-SAGARPA. Camino a los Cacaotales S/N, Metapa de Domínguez, CP 30860, Chiapas, México

Corresponding author: Félix D. Murillo (fmurillo@ecosur.edu.mx)

Academic editor: Mark Shaw | Received 3 July 2015 | Accepted 24 August 2015 | Published 30 November 2015

<http://zoobank.org/35180BB2-5388-4568-ACCA-BE29B053E138>

Citation: Murillo FD, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Liedo P, Montoya P (2015) *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). Journal of Hymenoptera Research 46: 91–105. doi: 10.3897/JHR.46.5586

Portada del artículo sobre la preferencia de oviposición del parasitoide nativo *D. areolatus* aceptado en la revista *Journal of Hymenoptera Research*.

● Track your article [ASD_667] accepted in Arthropod Structure and Development (5) Gente ★

● Elsevier - Article Status <Article_Status@elsevier.com> ene 14 a las 11:08 A.M. ★
Para felixdavidm@yahoo.com.mx

Please note this is a system generated email from an unmanned mailbox.
If you have any queries we really want to hear from
you via our 24/7 support at <http://service.elsevier.com>

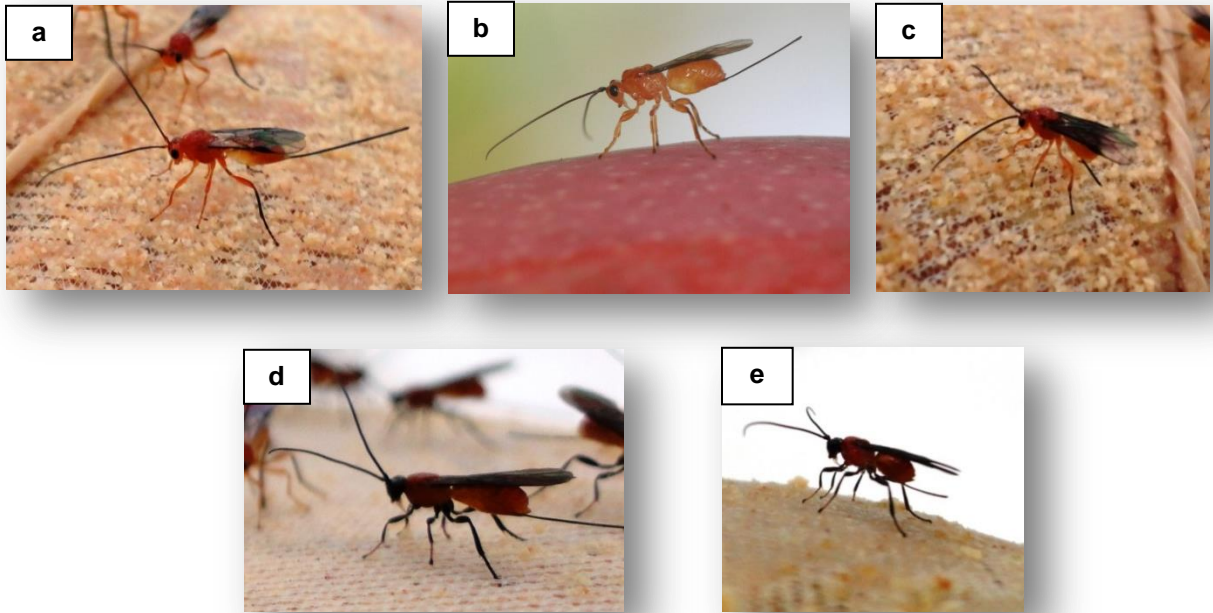
Article title: First instar larvae morphology of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of Anastrepha (Diptera: Tephritidae) fruit flies. Implications for interspecific competition
Article reference: ASD667
Journal title: Arthropod Structure and Development
Corresponding author: Mr. Felix D. Murillo
First author: Mr. Felix D. Murillo

Dear Mr. Murillo,

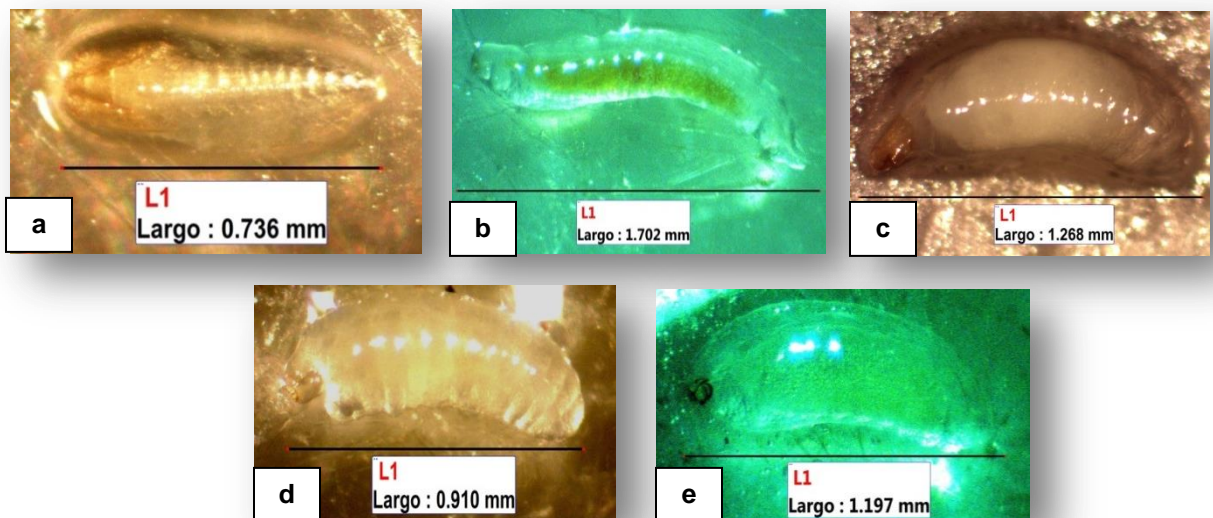
Your article First instar larvae morphology of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of Anastrepha (Diptera: Tephritidae) fruit flies. Implications for interspecific competition will be published in Arthropod Structure and Development.

To track the status of your article throughout the publication process, please use our article tracking service:

Correo electrónico de aceptación del artículo sobre morfología de larvas de primer instar de cuatro parasitoides nativos y *D. longicaudata* a la revista *Arthropod Structure & Development*.



Especies de parasitoides utilizados en los diversos trabajos de investigación. a. *Diachasmimorpha longicaudata*, b. *Doryctobracon areolatus*, c. *Utetes anastrephae*, d. *Doryctobracon crawfordi*, e. *Opius hirtus*, todos Opiine: Braconidae (Hymenoptera).



Larvas de primer instar de los parasitoides utilizados en los trabajos de investigación de la Tesis. a. *Diachasmimorpha longicaudata*, b. *Doryctobracon areolatus*, c. *Utetes anastrephae*, d. *Doryctobracon crawfordi*, e. *Opius hirtus*, todos Opiine: Braconidae (Hymenoptera).



Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido del Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Tapachula, Chiapas, bajo la dirección de la responsable de Laboratorio MC. Ma. Guadalupe Nieto López.



Laboratorio de Control Biológico del Departamento de Desarrollo de Métodos del Programa Moscafrut, SENASICA-SAGARPA, Metapa de Domínguez, Tapachula, bajo la dirección del Dr. Pablo J. Montoya Gerardo y responsable del Laboratorio Dr. Jorge Cancino.



Unidad de campo de ECOSUR en la Región centro de Veracruz, Municipio de Medellín de Bravo, a cargo del Dr. Héctor Cabrera Mireles. Donde se llevaron a cabo experimentos en jaulas de campo.



Región centro de Veracruz, municipio de Medellín de Bravo, donde se realizaron las evaluaciones de liberaciones por aumento de *D. longicaudata*, con la supervisión del Dr. Héctor Cabrera Mireles.



Hembras de *D. areolatus* parasitando larvas de moscas *A. obliqua* (izquierda) y hembras de *A. obliqua* infestado frutos de ciruelas *Spondias* (derecha) en la región centro de Veracruz, Municipio de Medellín de Bravo.