

Manual de Sistemas
Cuarentenarios para
Plagas Agrícolas
2016

A6

Técnica del insecto estéril

María Teresa Vera

El contenido de este capítulo ha sido provisto por el o los autores arriba mencionado/s. La EEAOC no es responsable de las opiniones aquí vertidas.



ESTACIÓN EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOBRES
Tucumán | Argentina

Universidad Nacional de Tucumán
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



I. La Técnica del Insecto Estéril

Cuando un área tiene presente una plaga, la única alternativa para que se la considere área libre es alcanzando dicho status a través de un programa de erradicación. Este tipo de programas deben contar con el apoyo del gobierno local, nacional, de los productores y del público en general. Las tareas de control deben encararse a nivel regional alcanzando todas las zonas que pueda utilizar la plaga como refugio es decir zonas con hospederos alternativos, áreas urbanas, etc. y no se deben llevar a cabo solamente en el área del cultivo. Este tipo de aproximación se conoce como de grandes áreas o en el término en inglés area-wide e involucra un esquema de manejo integrado de la plaga donde se emplean distintas medidas de control, incluyendo el control químico. Sin embargo, el incremento en la demanda de fruta libre de insecticidas (Hendrichs *et al.* 1995), así como el creciente número de especies resistentes a los mismos (Crampton 1993), han llevado a la necesidad de implementar otras medidas más específicas y/o amigables con el ambiente como ser el control biológico o el control genético (Ridgway *et al.* 1993). Dentro de este último, se encuentra el control autocida o técnica del insecto estéril (TIE).

La TIE fue propuesta por primera vez por Knippling (1955) para el manejo del gusano barrenador, *Cochliomya homnivorax* (Coquerel), una importante plaga del ganado en EEUU durante las décadas del 30-50. Esta técnica se basa en la capacidad de criar, esterilizar y liberar insectos, sexualmente competitivos con los individuos silvestres, de manera tal que aquellas hembras silvestres que se apareen solamente con un macho estéril no producirán descendencia. Liberando un número suficiente de insectos estériles en la naturaleza durante un período que cubra varias generaciones, el éxito reproductivo de la población silvestre se ve reducido en forma progresiva y finalmente llega a cero. De esta forma es posible lograr la eliminación de la plaga en dicha región. Para alcanzar la erradicación, toda la población plaga debe ser atacada. Si se comienza en determinadas áreas, es necesario entonces garantizar que las vías de reinfestación estén controladas ya sea a través de puestos de cuarentena en los puntos de entrada de productos con plaga o a través de la liberación de machos estériles en las zonas adyacentes (áreas buffer) para crear una barrera más ancha que el rango de vuelo del insecto.

Características de la TIE

El uso con éxito de esta técnica para la erradicación

de una plaga requiere el cumplimiento de varios aspectos (Gilmore 1986, Dycks *et al.* 2005). En primer lugar el área donde se intenta erradicar debe cumplir con ciertas características ecológicas que permitan que este objetivo sea viable. Luego, en lo que respecta a la técnica en sí, se debe garantizar la provisión adecuada de insectos estériles y que los mismos sean de calidad. La provisión de insectos se logra desarrollando protocolos para establecer insectarios de cría masiva. Esto implica lograr criar individuos a un bajo costo en cantidades lo suficientemente grandes como para cubrir las demandas de las zonas de liberación. El paso siguiente es lograr establecer la metodología de esterilización.

Proceso de esterilización

La esterilidad sexual puede ser inducida en la especie plaga ya sea por medios químicos (agentes quelantes, antimetabolitos) o físicos (radiaciones ionizantes con rayos X o gamma, o con neutrones). Hasta el momento no se encontraron esterilizantes químicos que no presenten al menos un cierto riesgo para los operarios de los insectarios. Existe sin embargo, la propuesta del uso de ciertos reguladores del crecimiento que aplicados en la naturaleza junto a cebos específicos para la especie podrían esterilizar a los individuos silvestres (Casana-Giner 1999, Navarro-Loppis *et al.* 2004, 2006). Sin embargo, esta práctica debe ser previamente evaluada en cada sitio ya que puede conllevar el riesgo de disminuir niveles poblacionales de otras especies no plaga si los cebos no son altamente específicos. Como consecuencia, en la actualidad la esterilidad es alcanzada utilizando la radiación emitida por radioisótopos como el Cesio-137 o el Cobalto-60 y se está promoviendo el uso de los rayos X (Bakri *et al.* 2005, Mastrangelo *et al.* 2010).

La esterilidad inducida a través de la exposición a rayos gamma dañan los cromosomas del esperma ya que produce rupturas en los mismos. Cuando los huevos de las hembras silvestres son fecundados con esperma de machos irradiados, la división celular se imposibilita y el embrión muere. Esto sucede generalmente al inicio del proceso de embriogénesis y como consecuencia, no se completa el desarrollo embrionario. Cuando el embrión logra desarrollar y eclosiona la larva, es muy probable que muera durante los estadios inmaduros o que produzca un adulto estéril. Todo esto depende de la dosis con que se irradió previamente. Es por ello que, si bien debe esterilizar al individuo, debe minimizar también cualquier efecto adverso sobre la longevidad, el

comportamiento de búsqueda, tanto de alimento como de pareja, y sobre la capacidad de aparearse.

Líneas de sexado genético

Existen casos donde la TIE no se puede aplicar porque la liberación de hembras, aún estériles, causa un importante daño. Esto sucede, por ejemplo, en mosquitos donde la hembra conserva la capacidad de picar y transmitir enfermedades y también, aunque ocasionando un menor daño, en moscas de la fruta donde la hembra estéril mantiene el comportamiento de oviposición y por tanto, al insertar el ovipositor permite el ingreso de patógenos en la fruta y disminuye su calidad. Es así como se propuso el uso de líneas de laboratorio que permitan separar los sexos en forma efectiva a grandes escalas, obteniéndose lo que se denomina líneas de sexado genético (LSG). El desarrollo de una LSG fue propuesto por Whitten (1969). Básicamente una LSG consiste en una cepa que tiene una porción de un cromosoma autosómico traslocado con el cromosoma sexual Y (cromosoma del macho). Dicha porción del cromosoma lleva un gen portador de una mutación recesiva para un carácter de fácil reconocimiento a nivel masivo. El cromosoma traslocado lleva el gen no mutado mientras que el cromosoma normal lleva el gen mutado. Esto permite que la hembra siempre sea homocigota recesiva para dicha mutación y el macho heterocigota, y por lo tanto no muestre dicho carácter. Un ejemplo de LSG que se utiliza con mucho éxito es el de las cepas *tsl* en la mosca de la fruta del Mediterráneo, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). En este caso, las hembras llevan un gen letal termo-sensible y mueren cuando son expuestas a temperaturas mayores a 28 °C. Los machos al ser heterocigotas no mueren. De esta forma durante el proceso de cría masiva es posible eliminar todas las hembras mientras se incuban los huevos previo al sembrado en la dieta larvaria. Esto tiene la gran ventaja de producir, y en consecuencia liberar, solamente machos y de reducir sustancialmente los costos de cría al no tener que considerar la dieta de las larvas que originarían hembras.

Hacia una TIE más efectiva

El éxito de la TIE radica en la capacidad de los machos liberados de desencadenar en la hembra una respuesta similar a la desencadenada a partir de la cópula con un macho de la naturaleza. Esto implica reducir su receptividad sexual y evitar, en consecuencia que se aparee nuevamente y desencadenar, eventualmente, el comportamiento

de oviposición. Para lograr esto los machos deben ser capaces de sobrevivir en el campo hasta alcanzar la madurez sexual, desplegar todos los comportamientos del cortejo y lograr aparearse con las hembras silvestres, lo que comúnmente se denomina, ser competitivos. Una forma de aumentar la eficiencia es logrando una relación estéril:fértil óptima, ya que al aumentar la cantidad de machos estériles que se liberan, se puede lograr que la gran mayoría de las cópulas involucren machos estériles. Estudios recientes analizan el impacto del tipo de cortejo que realizan los machos en la relación estéril:fértil óptima en campo (Shelly & McInnis 2016). Es necesario para llegar a una relación estéril:fértil operativa, reducir significativamente la población silvestre con otras medidas de control previo a la liberación de machos estériles. Es así que al inicio de los programas de erradicación con TIE se contemplan una o dos campañas con el uso de otra medida de control para bajar los niveles poblacionales como, por ejemplo, el control químico. Asimismo, en los últimos años se trabajó mucho en el uso de sustancias que potencien la competitividad de los machos (Shelly *et al.* 2007) o en proveer a los machos estériles, previo a su liberación, un alimento rico en proteínas que les permita tener una ventaja competitiva (Pereira *et al.* 2013). En las especies con largo tiempo de maduración sexual, se le puede sumar el uso de aceleradores de la maduración sexual incrementando entonces el rendimiento de los insectos liberados.

Uso de la TIE en moscas de la fruta de la familia Tephritidae

En vistas del éxito de la aplicación de la TIE para el control del gusano barrenador, se evaluó su posible aplicación en otros insectos. Dentro de la familia Tephritidae, los candidatos a experimentar fueron *Ceratitidis capitata*; la mosca oriental de la fruta, *Bactrocera dorsalis* (Hendel); la mosca del melón, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett); la mosca del olivo, *Bactrocera oleae* (Gmelin) y la mosca de la fruta de Queensland, *Bactrocera tryoni* (Froggatt). Si bien algunas especies quedaron en la etapa de investigación, esta técnica tuvo mucho éxito y cuenta con varios casos donde se logró la erradicación con éxito de la plaga como ser Japón, Chile y Patagonia (Kuba *et al.* 1996, Enkerlin 2005, Rial *et al.* 2006). Para el caso de *C. capitata* ya en 1959 se realizaron estudios a campo cubriendo un área de 31 km². Actualmente el uso en esta especie es generalizado y varios países, incluyendo Argentina, cuentan con biofábricas para la producción de machos estériles de *C. capitata*, llegando en el caso de Guatemala a niveles de 2.000 millones de machos semanales

(Bioplanta El Pino). Además del uso de la TIE en *C. capitata*, existen antecedentes de su uso en los géneros *Bactrocera* y *Anastrepha*. Con respecto al género *Anastrepha*, en la actualidad se la emplea en el control de la mosca Mejicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew) en Méjico y en las regiones de California y del valle del río Grande, Texas, EEUU. Las liberaciones se realizan para mantener dichas zonas libres de la plaga. Asimismo el programa Moscamed-Moscafrut de Méjico, posee un insectario para la cría masiva y liberación de individuos estériles de la mosca de las Indias Occidentales o mosca de las ciruelas, *Anastrepha obliqua* (Macquart).

II. Las moscas de la fruta en la Argentina

En Argentina se encuentran presentes dos especies de moscas que se consideran importantes plaga de frutales, *Anastrepha fraterculus* y *Ceratitis capitata*. La primera, llamada mosca sudamericana de la fruta es originaria de este continente, mientras que la mosca de la fruta del Mediterráneo, es originaria de África y fue introducida a principios del siglo XX (Vergani 1952). El impacto económico que producen estas especies por daño directo se estima entre el 15 y 20% de la producción frutícola (Alvarado & Ritacco 1990). El Programa Nacional de Control y Erradicación de Moscas de los Frutos (PROCEN) dependiente del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, (SENASA) presenta actualmente distintos subprogramas en distintas regiones del país tendientes al control de estas especies plaga (Guillen & Sánchez 2007). En una etapa inicial se comenzó con la implementación de medidas de control y erradicación en zonas donde *C. capitata* es la única especie presente y con características ecológicas favorables para la erradicación de la plaga. Las acciones de control se basan en el uso de la TIE y en el establecimiento de barreras de inspección que impidan el reingreso de la misma a través del comercio de fruta con zonas infestadas (Aruani *et al.* 1996, De Longo *et al.* 2000, Sanchez *et al.* 2001). Para *A. fraterculus*, se cuenta con el control químico como única alternativa. Esta medida es incompatible con el uso de la TIE para *C. capitata* ya que los cebos no son específicos para una determinada especie y se corre el riesgo de matar a los insectos estériles que se liberan. Es por ello que se promueve el desarrollo y uso de la TIE para el control de *A. fraterculus* (Ortiz 1999).

III. Desarrollo de la TIE en *Anastrepha fraterculus*

El desarrollo de la TIE en una nueva especie requiere

de sólidos conocimientos de la biología de la misma, así como de la posibilidad de criarla en grandes escalas, esterilizar a los individuos y lograr que sean competitivos. Actualmente los conocimientos sobre la biología de *A. fraterculus* son escasos en comparación a los conocimientos sobre la biología de *C. capitata*, especie de amplia distribución y de importancia sanitaria en muchos países del mundo. Es por ello que en los últimos años tanto a nivel mundial como en Argentina se priorizó el estudio de *A. fraterculus*, en especial en lo que refiere al desarrollo de la TIE (Cladera *et al.* 2014, Hendrichs *et al.* 2015).

Biología de *Anastrepha fraterculus*

La mosca Sudamericana de la fruta está presente en casi todo el continente americano incluyendo Argentina (Salles 1995, Steck 1998). Las hembras depositan sus huevos en más de 100 especies frutales (Norrbon & Kim 1988, Norrbom 2004), por lo que es considerada una plaga de alta importancia económica (Steck 1998). Esta especie presenta una importante variación morfológica entre poblaciones, discontinuidades genéticas, diferencias cariotípicas, en la composición química de los hidrocarburos de cutícula y de los volátiles emitidos por los machos y en el comportamiento reproductivo por lo que se postuló que la misma correspondería a un complejo de especies crípticas. (ver Steck 1998 para una revisión y posteriormente Hernández-Ortiz *et al.* 2004, 2012, Smith-Caldas *et al.* 2001, Selivon *et al.* 2005). Asimismo presenta barreras reproductivas entre determinadas poblaciones (Selivon *et al.*, 1997, 1999, 2005, Vera *et al.*, 2006, Rull *et al.* 2012, 2013, Devescovi *et al.* 2014). A fines de brindar un estudio multidisciplinario entre 2010 y 2015 se llevó a cabo un proyecto de investigación que involucró distintos países y distintos enfoques (Hendrichs *et al.* 2015). Los resultados obtenidos permitieron proponer la presencia de al menos ocho especies (Hernández-Ortiz *et al.* 2015).

Dentro de Argentina, los estudios de compatibilidad sexual que se realizaron entre distintas poblaciones no encontraron evidencias de aislamiento etológico (Petit-Marty 1999, Petit-Marty *et al.* 2004a). Tampoco se encontraron evidencias de barreras reproductivas postcigóticas como mortalidad diferencial de machos o esterilidad en híbridos (Petit-Marty *et al.* 2004b). Estos resultados permiten postular que, en nuestro país, *A. fraterculus* es una sola especie, hecho que se ve sustentado por los resultados obtenidos en estudios realizados a nivel genético (Basso & Manso 2001, Alberti *et al.* 2002, Alberti 2004, Alberti *et al.*

2008). La confirmación que *A. fraterculus* es una sola especie dentro de Argentina, así como el hecho que esta especie presenta una distribución que incluye el sur de Brasil (Rull *et al.* 2012) resulta prometedor para el desarrollo de la TIE dentro de nuestro país.

Cría artificial

En lo que respecta a los avances hacia una cría masiva, en la EEAO, se estableció en 1997 una cría experimental. Posteriormente, se determinaron parámetros para el control de la calidad (Vera *et al.* 2007) y se evaluaron distintas dietas para larvas (Vera *et al.* 2014). Asimismo, se evaluó el efecto de la forma de suministrar los nutrientes en la dieta de adultos en distintos parámetros biológicos como ser longevidad, fecundidad y fertilidad (Oviedo *et al.* 2011).

Proceso de esterilización

Por su parte, en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), se determinó el momento y la dosis de irradiación necesaria para lograr la esterilización de los individuos (Allinghi 2002, Allinghi *et al.* 2007a). Se analizó en condiciones de laboratorio el efecto de distintas dosis de radiación gamma y el momento de aplicación de las mismas sobre la fertilidad de esta especie. Se aplicaron dosis de 50, 70 y 90 Gy sobre pupas 24, 48, 72 y 96 hs antes de la emergencia de los adultos. Asimismo, se evaluó el efecto de dosis de 20, 40 y 60 Gy, aplicadas a pupas 48 h antes de la emergencia, sobre la fertilidad de machos, hembras y la transferencia de espermias. Los resultados mostraron que la fertilidad de los machos no varió significativamente en función del momento de irradiación estudiado. En cuanto al efecto de la dosis de irradiación sobre la fertilidad de machos y hembras se verificó que la fertilidad de los machos irradiados con 60 Gy, cruzados con hembras no irradiadas, es cercana al 1% mientras que hembras irradiadas con dosis de 40 Gy, cruzadas con machos no irradiados, no produjeron huevos. Esto permite

concluir que dosis de 70 Gy, aplicadas 48 hs antes de la emergencia de los adultos son suficientes para inducir 100% de esterilidad en machos y hembras.

Evaluación de la calidad de los machos estériles

Actualmente los programas de control y erradicación de moscas de los frutos, que basan sus actividades principalmente en el uso de la TIE, realizan ensayos para determinar la calidad de los machos liberados (FAO/IAEA/USDA 2014). En los mismos se evalúa la supervivencia a campo de moscas estériles y se determina en condiciones de semi-campo la competitividad sexual de los machos estériles a través del registro del número de cópulas que obtienen los machos estériles con relación al número que obtienen los machos silvestres. Una medida más eficiente de la calidad de los machos, pero que por resultar más trabajosa no siempre es determinada, consiste en medir la capacidad de inducir esterilidad en las hembras silvestres. Esto significa evaluar cuán capaces son los machos de bajar los niveles naturales de eclosión de huevos en presencia de machos silvestres. Estudios realizados en condiciones de semi-campo demostraron que las condiciones de cría semimasiva establecidas en la EEAO garantizan machos competitivos (Allinghi *et al.* 2007b). A esto se suma el hecho que la exposición a los volátiles de ciertas plantas pueden incrementar la competitividad sexual de los machos (Vera *et al.* 2013, Bachmann *et al.* 2015). Por último, analizar los factores que determinan cambios en la receptividad de la hembra luego de la cópula (Abraham *et al.* 2011a, b, 2012, 2013, 2015).

Es así como los resultados obtenidos hasta el momento permiten proponer a la TIE como una herramienta factible de ser utilizada para el control de *A. fraterculus*. Esto permitiría el uso combinado de la TIE para el control de ambas especies de moscas de los frutos de importancia cuarentenario dentro de Argentina.

Bibliografía recomendada

Abraham, S., L. Goane, J. Rull, J.L. Cladera, E. Willink & M.T. Vera. 2011a. Multiple mating in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females and its relationship with fecundity and fertility. Ent. Exp. et Appl. 141: 15-24.

Abraham, S., L. Goane, J.L.

Cladera & M.T. Vera. 2011b. Effects of male nutrition on sperm storage and remating behavior in wild and laboratory *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females. J. Insect Physiol. 57: 1501-1509.

Abraham, S., J.L. Cladera, L. Goane & M.T. Vera. 2012. Factors

affecting *Anastrepha fraterculus* female receptivity modulation by accessory gland products. J. Insect Physiol. 58: 1-6.

Abraham, S., M.C. Liendo, F. Devescovi, P.A. Peralta, V. Yusef, J. Ruiz, J.L. Cladera, M.T. Vera & D.F. Segura. 2013. Remating behaviour

in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females is affected by male juvenile hormone analogue treatment but not by male sterilization. Bull. Entomol. Res. 103: 310-317. doi:10.1017/S0007485312000727.

Abraham, S., M.T. Vera & D. Pérez-Staples. 2015. Current sperm competition determines Sperm Allocation in a Tephritid Fruit Fly. Ethology 120: 1-11.

Alberti, A. C., M. S. Rodriguez, P. Gomez-Cendra, B. O. Saidman & J.C. Vilardi. 2002. Evidence indicating that Argentinean populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) belong to a single biological species. Ann. Entomol. Soc. Am. 95: 505-512.

Alberti, A. C. 2004. Las poblaciones Argentinas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) conforman una única especie biológica? Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Alberti, A., V. A. Confalonieri, R.O. Zandomeni & J. C. Vilardi. 2008. Phylogeographic studies on natural populations of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Genetica 132: 1-8.

Allinghi, A. 2002. Inducción de esterilidad en la Mosca Sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) mediante radiación gamma, para su aplicación en el control genético. Tesis de Maestría. Universidad Nacional General San Martín, Argentina.

Allinghi, A, M. C. Gramajo, E. Willink & J. C. Vilardi. 2007a. Induction of sterility in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by means of gamma radiation. Fla Entomol. 90: 96-102.

Allinghi, A., G. Calcagno, N. Petit-Marty, P. Gómez Cendra, D. Segura, M. T. Vera, J. Cladera, C. Gramajo, E. Willink & J. C. Vilardi. 2007b. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. Fla Entomol. 90: 27-32.

Alvarado, L. & M. Ritacco. 1990. Manejo Integrado de Moscas de los Frutos. Seminario-Taller: INTA-CNEA.

Aruani, R., A. Ceresa, J. C. Granados, G. Taret, P. Peruzzotti & G. Ortiz. 1996. Advances in the National Fruit Fly Control and Eradication Program in Argentina. En: Mc Pheron y Steck [Eds.] Fruit Fly Pests. A World Assessment of their Biology and Management. St. Lucie Press. 521-530.

Bachmann, G.E. D.F. Segura, F. Devescovi, M.L. Juárez, M.J. Ruiz, M.T. Vera, J. Cladera, P.E. Teal, P.C. Fernandez. 2015. Male sexual behaviour and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. PlosOne 10 (4): e0124250. DOI:10.1371/journal.pone.0124250.

Bakri, A., K. Mehta & D. R. Lance. 2005. Sterilizing insects with ionizing radiation. En: Dyck, V. A., J. Hendrichs & A. S. Robinson [Eds.] Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer. 233-268.

Basso, A. & F. C. Manso. 1998. Are *Anastrepha fraterculus* chromosomal polymorphisms an isolation barrier? Cytobios. 93: 103-111.

Casana-Giner, V., A. Gandia-Balaguer, C. Mengod-Puerta, J. Primo-Millo & E. Primo-Yufera. 1999. Insect growth regulators as chemosterilants for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Ent. 92: 303-308.

Cladera, J. L., J. C. Vilardi, M. Juri, L. E. Paulin, M. C. Giardini, P. V. G. Gómez-Cendra, D. F. Segura & S. B. Lanzavecchia. 2014. Genetics and biology of *Anastrepha fraterculus*: research supporting the use of the sterile insect technique (SIT) to control this pest in Argentina. BMC genetics, 15(Suppl 2): S12.

Crampton, J. M. 1993. Genetic engineering of insects and applications in basic and applied entomology. En: Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques. Vic Library Cataloging in Publication Data. 33-47.

De Longo, O., A. Colombo, P. Gomez-Riera & A. Bartolucci. 2000. The use of massive SIT for the control of the Medfly, *Ceratitis capitata* (Wied.), Strain SEIB 6-96, in Mendoza, Argentina. En: Tan, K-H. [Ed.] Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Penerbit Universiti Sains Malaysia Press, Malasia. 351-360.

Devescovi, F., S. Abraham, A.K. Passos Roriz, N. Nolazco, R. Castañeda, E. Tadeo, C. Caceres, D.F. Segura, M.T. Vera, I. Joachim-Bravo, N. Canal & J. Rull. 2014. Ongoing speciation within the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex: the case of the Andean morphotype. Ent. Exp. Appl. 152: 238-247.

Dycks, V. A., J. Hendrichs & A. S. Robinson. 2005. Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer.

Enkerlin, W. R. 2005. Impact of Fruit Fly Control Programmes using the Sterile Insect Technique. Pp. 651-676. En: Dycks, V. A., J. Hendrichs & A. S. Robinson, [Eds.] Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer.

FAO/IAEA/USDA. 2014. Manual for Product Quality Control and Shipping Procedures for Sterile Mass-Reared Tephritid Fruit Flies, Version 6.0. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

Guilmore, J. E. 1989. Sterile Insect Technique. En: Robinson, A. S. & G. Hooper. Fruit Flies: Their Biology and Natural Enemies. Elsevier, Amsterdam, pp. 353-364.

Guillén, D., & R. Sánchez 2007. Expansion of the national fruit fly control programme in Argentina. In Area-wide control of insect pests (pp. 653-660). Springer Netherlands.

Hendrichs, J., G. Franz & P. Rendón. 1995. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of the Mediterranean fruit fly during fruiting

seasons. *J. Appl. Entomol.* 119, 371-377.

Hendrichs, J., M. T. Vera, M.

De Meyer & A. R. Clarke. 2015.

Resolving cryptic species complexes of major tephritid pests. *ZooKeys* 540: 5-39.

Hernández-Ortiz, V. 1992.

El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae): taxonomía, distribución y plantas hospederas. Xalapa, México. *Inst. de Ecología - Soc. Méx. Entomol. Publ. n°33.* 162 pp.

Hernández-Ortiz, V., J. A.

Gómez-Amaya, A. Sánchez, B.

A. McPheron, & M. Aluja. 2004.

Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bull. Entomol. Res.* 94: 487-499.

Hernández-Ortiz, V., Bartolucci, A.

F., Morales-Valles, P., Frías, D., &

Selivon, D. 2012.

Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 105(2), 305-318.

Hernández-Ortiz, V., Canal, N. A.,

Salas, J. O. T., Ruíz-Hurtado, F. M.,

& Dzul-Cauich, J. F. 2015.

Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Mesoamerican and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). *ZooKeys* (540): 95.

Jaldo, H. E., M. C. Gramajo &

E. Willink. 2001.

Mass rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): a preliminary strategy. *Fla. Entomol.* 84(4):716-718.

Knipling, G. F. 1955.

Possibilities of insect control of eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* 48:459-462.

Kuba, H., T. Kohama, H.

Kakinohana, M. Yamagishi, K.

Finjo, Y. Sokei, T. Nakasone y Y.

Nakamoto. 1996. The successful eradication programs of the melon fly in Okinawa. Pp. 543-550. *En: B. A.*

McPheron & G. J. Steck [Eds.] *Fruit Fly Pests. A world assessment of their biology and management.* St. Lucie Press, Delray Beach, Fl. USA.

Mastrangelo, T., A. G. Parker, A.

Jessup, R. Pereira, D. Orozco-

Dávila, A. Islam, T. Damalage

& J. M. M. Walder. 2010.

A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *J. Econ. Entomol.* 103: 85-94.

Navarro-Llopis, V. J. Sanchis-

Cabanes, I. Ayala, V. Casana-Giner

y E. Primo-Yufera. 2004.

Efficacy of lufenuron as chemosterilant against *Ceratitidis capitata* in field trials. *Pest Man. Sci.* 60: 914-920.

Navarro-Llopis, V., J. Sanchis-

Cabanes, Primo-Millo, J and Primo-

Yufera, E. 2007.

Chemosterilants as control agents of *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) in field trials. *Bulletin of Entomological Research.* 97 359-368.

Norrbom, A. L. & K. C. Kim. 1988.

A list of the reported host plant of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), 114 pp. U.S. Dep. Agric., Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine, Washington, DC.

Norrbom, A. L. 2004.

Fruit fly (Tephritidae) host plant database. Nov., 2004. (<http://www.sel.barc.usda.gov:591/diptera/Tephritidae/TephHosts/search.html>).

Ortiz, G. 1999.

Potential use of the sterile insect technique against the South American fruit fly, pp. 121-130. *En: The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.): advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies.* International Atomic Energy Agency, IAEA Tech-Doc 1064. Austria.

Oviedo, A., D. Nestel, N. T.

Papadopoulos, M. J. Ruiz, S. C.

Prieto, E. Willink & M. T. Vera. 2011.

Management of protein intake in the fruit fly *Anastrepha fraterculus*. *J. Insect Physiol.* 57: 1622-1630.

Pereira, R., B. Yuval, P. Liedo, P. E.

A. Teal, T. E. Shelly, D. O. McInnis

& J. Hendrichs. 2013.

Improving

sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *J. Appl. Entomol.* 137(s1): 178-190.

Petit-Marty, N. 1999.

Estudios sobre comportamiento reproductivo de dos poblaciones silvestres de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) de Argentina. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Argentina.

Petit-Marty, N., M. T. Vera, G.

Calcagno, J. L. Cladera, D. F.

Segura, A. Allinghi, M. Rodriguez,

P. Gómez Cendra, M. M. Viscarret

& J. C. Vilardi. 2004a.

Sexual Behaviour and Mating Compatibility Among Four Populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 1320-1327.

Petit-Marty, N., M. T. Vera, G.

Calcagno, J. L. Cladera & J. C.

Vilardi. 2004b.

Lack of post-mating isolation between two populations of *Anastrepha fraterculus* from different ecological regions in Argentina, pp. 79-82. *En: Proceedings of the 6th International Fruit Fly Symposium, 6-10 May 2002, Stellenbosch, South Africa.*

Rial, E. A. P. Mongabure & C. A.

Borges. 2006.

Fruit Fly Eradication Programme in Patagonia, Argentina. *En: Actas del 7th Symposium of Fruit Flies of Economic Importance.* 10 al 15 de septiembre, Salvador Bahia, Brasil.

Rull, J., S. Abraham, A. Kovaleski,

D.F. Segura, A. Islam, V.

Wornoayporn, T. Dammalage, U.

Santo Tomas & M.T. Vera. 2012.

Random Mating and Reproductive Compatibility among Argentinean and Southern Brazilian Populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.* 102: 435-443.

Rull, J., S. Abraham, A. Kovaleski,

D. F. Segura, M. Mendoza,

M. C. Liendo and M. T. Vera.

2013. Evolution of prezygotic and postzygotic barriers to gene flow among three cryptic species within the *Anastrepha fraterculus* complex. *Ent. Exp et Appl.* 148: 213-222.

Salles, L. A. B. 1995. Bioecologia e Control da Moscas das Frutas Sul-Americanas. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, Brasil.

Sánchez, R. A., E. J. Rial & A. P. Mongabure. 2001. Advances in the programme for the eradication of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*, Wied.) in the Patagonian region, Argentina. 2001. En: Actas del 4to Encuentro de Trabajadores en Moscas de la Fruta del Hemisferio Occidental. Mendoza, Argentina.

Selivon D., J. S. Morgante & A. L. P. Perondini. 1997. Egg size, yolk mass extrusion and hatching behaviour in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Brazilian Journal of Genetics 20: 587-594.

Selivon D., A. L. P. Perondini & J. S. Morgante. 1999. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Genetics and Molecular Biology 22: 507-510.

Selivon, D., A. L. P. Perondini & J. S. Morgante. 2005. A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 98: 367-381.

Shelly, T., J. Edu, E. Pahio & J. Nishimoto. 2007. Scented Males and Choosy Females: Does Male Odor Influence Female Mate Choice in the Mediterranean Fruit Fly? J Chem Ecol. 33:2308-2324

Shelly, T & D.O. McInnis. Sterile Insect Technique and Control of Tephritid Fruit Flies: Do Species With Complex Courtship Require Higher Overflooding Ratios? Ann. Ent. Soc. Am. 109: 1-11.

Smith-Caldas, M. R. B., B. A. McPheron, J. G. Silva & R. A. Zucchi. 2001. Phylogenetic relationships among species of the fraterculus group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. Neotrop. Entomol. 30:565-573.

Steck, G. J. 1998. Taxonomic status of *Anastrepha fraterculus*, pp 13-20. En: The South American Fruit Fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.); advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies. IAEA- TECDOC 1064. IAEA, Vienna, Austria.

Vera, M. T., C. Cáceres, V. Wornoayporn, A. Islam, A. S. Robinson, M. H. de la Vega, J. Hendrichs, & J-P Cayol. 2006. Mating Incompatibility among populations of the South American

Fruit Fly *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 99: 387-397.

Vera, M. T., S. Abraham, A. Oviedo y E. Willink. 2007. Demographic and quality control parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) artificial rearing. Fla. Entomol. 90: 53-57.

Vera, M. T., M. J. Ruiz, A. Oviedo, S. Abraham, M. Mendoza, D. F. Segura, N. A. Kouloussis and E. Willink. 2013. Fruit compounds affect male sexual success in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). J. App. Entomol. 137 (suppl.) 2-10.

Vera, M.T., A. Oviedo, S. Abraham, M.J. Ruiz, M. Mendoza, C.L. Chang y E. Willink. 2014. Larval diet development for the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Int. J. Trop. Insect Sci. 34 S73-S81.

Vergani, A. R. 1952. La mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata*. Publ. Inst. San. Veg. M.A.G.N. Serie B, Nº22.

Whitten, M. J. 1969. Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects. J. Econ. Entomol. 62:272-273.