Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Comportamiento reproductivo en la Mosca del Mediterráneo, Ceratitis capitata (Díptera: Tephritidae) y su aplicación en programas de Control Genético

Calcagno, Graciela Elena

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Calcagno, Graciela Elena. (2001). Comportamiento reproductivo en la Mosca del Mediterráneo, Ceratitis capitata (Díptera: Tephritidae) y su aplicación en programas de Control Genético. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3318_Calcagno.pdf

Cita tipo Chicago:
Calcagno, Graciela Elena. "Comportamiento reproductivo en la Mosca del Mediterráneo, Ceratitis capitata (Díptera: Tephritidae) y su aplicación en programas de Control Genético". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3318_Calcagno.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293
Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Comportamiento Reproductivo en la Mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) y su Aplicación en Programas de Control Genético

Graciela Elena Calcagno

Director
Prof. Dr. Juan Cesar Vilardi

Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas

Laboratorio de Genética de Poblaciones
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

2001

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi Director, Dr. Juan C. Vilardi, por abrirme las puertas de su laboratorio, permitirme trabajar en un tema tan interesante como es el control de plagas y darme la oportunidad de realizar esta tesis.

A la Universidad de Buenos Aires por haberme otorgado las becas de Iniciación y Perfeccionamiento, sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible.

A las Instituciones que gracias a sus contratos de investigación otorgados a mi Director fueron el soporte económico para llevar a cabo este trabajo: Agencia Nacional de Energía Atómica (IAEA), Contrato de Investigación N° 7697/R2, Universidad de Buenos Aires (PID Tw09), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) (PIP 0722/98) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2269 y 6628).

Al Instituto de Genética "Ewald Favret" CNIA, INTA, Castelar, donde pude consultar gran parte de la bibliografía, especialmente a la Lic. Fanny Manso por el material biológico otorgado y al Dr. Jorge Cladera por su honestidad y sus consejos.

A la Lic.Teresa Vera, quien se inició junto a mí en el trabajo con las moscas, quiero agradecerle especialmente por su ayuda, entusiasmo y por los momentos compartidos.

A la Licenciada Natalia Petit por el material de Concordia y principalmente por sus horas de compañía y simpatía.

Al Ing. Agr. Armando Allinghi de CNEA-Ezeiza, por la irradiación del material y por su ayuda y buena disposición en los experimentos compartidos.

Al Dr. Fabian Norry por su colaboración en los análisis estadísticos.

A mis compañeras de cuarto por los años compartidos, a María Isabel por sus consejos, a Sara por hacerme los días más alegres, a Marcela por su confianza.

A Vivi, Bety, Andrea y Laura por sus consejos, experiencia y afecto.

A Pablo y a Cecilia C.; a las "chicas", Cecilia B., Marina, Paula, Paola, Amalia, Verónica, por su alegría y por los almuerzos y cafés de todos estos años.

Quiero agradecer finalmente a mis amores. A Jorge, a quien quiero con toda mi alma, por tener tanta paciencia y comprensión en esta etapa de mi vida. A mis dos soles, Constanza y Magali por hacerme tan feliz. A mis padres y hermanos por su interés y preocupación permanente.

INDICE

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

INTRODUCCIÓN 3

1. *Ceratitis capitata.* Características generales 4

2. Taxonomía de *Ceratitis capitata* 6

3. Ciclo de vida 7

4. Origen y distribución 8

5. Hospederos e importancia como plaga 9

6. Métodos de control 10

   6.1 Control químico 11

   6.2 Enemigos naturales y control biológico 13

   6.3 Control genético: Técnica del insecto estéril 15

7. Desarrollo de líneas de cría masiva, autosexado genético 17

   7.1 Componentes de LSG en *C. capitata* 19

   7.2 Determinación del sexo en *C. capitata* 20

   7.3 Translocaciones del macho 21

   7.4 Inducción y aislamiento 21

   7.5 Genes separadores de sexos 22

   7.6 Recombinación en machos 23

   7.7 Utilización de LSG en la TIE 23

8. Situación del control de la plaga 24

9. Situación actual del Programa Nacional de Moscas de los Frutos (PROCEM) en Argentina. 24

10. Teoría de la selección sexual 26

11. Sistema de apareamiento 28

12. Comportamiento sexual en moscas de la fruta 30

   12.1 Estímulos 32

12.2 Competencia Intrasexual 34
12.3 Elección de pareja 36
12.4 Estrategias alternativas del macho 38
12.5 Comparación de moscas criadas en el laboratorio y salvajes 39
OBJETIVOS 43
MATERIAL Y METODOS 44
1. Obtención de material vivo 45
1.1. Obtención de moscas silvestres 45
1.2. Cría de líneas en laboratorio 46
2. Métodos experimentales 47
2.1. Experimentos en jaulas de campo 47
2.1.1. Jaulas 47
2.1.2. Marcado de moscas 48
2.1.3. Desarrollo del experimento 48
2.2. Experimentos de video grabación 50
CAPITULO I: ***Determinación de las condiciones óptimas de apareamiento en jaulas de campo***
1.1 Introducción 55
1.2 Material y Métodos 57
1.2.1 Obtención de moscas silvestres 57
1.2.2 Desarrollo del experimento 57
1.2.3 Métodos estadísticos 58
1.2.3.1 Efecto de la edad 58
1.2.3.2 Efecto de las variables físicas y climáticas 59
1.3 Resultados 59
1.3.1 Efecto de la edad 59
1.3.2 Efecto de variables físicas y climáticas 59
1.3.3 Distribución de parejas en la jaula 61
1.4 Discusión 63
1.4.1 Factores ambientales 63
1.4.2 Efecto de la edad 66

CAPITULO II: ***Análisis del cortejo del macho de C. capitata por el método de videograbación y detección de diferencias entre una línea de cría masiva y moscas salvajes***

2.1 Introducción 68

2.2 Material y Métodos 72

2.3 Resultados 73

2.4 Discusión 90

2.4.1 Cortejo 90

2.4.2 Comparación de moscas de cría masiva con salvajes 93

CAPITULO III: Los efectos de la irradiación sobre el comportamiento sexual de C. capitata: Análisis en jaulas de campo y por videograbaciones

3.1. Introducción 101

3.2 Material y Métodos 103

3.2.1 Experimento de video grabación 103

3.2.2 Experiencias en jaulas de campo 105

3.2.2.1 Radiación X 105

3.2.2.2 Rayos gamma 106

3.3 Resultados 107

3.3.1 Experimento de video grabación 107

3.3.2 Experimentos en jaula de campo 115

3.3.2.1 Rayos X 115

3.3.2.1.1 Porcentaje de apareamiento 115

3.3.2.1.2 Distribución espacial de los apareamientos 116

3.3.2.1.3 Distribución temporal de los apareamientos 117

3.3.2.2 Rayos gamma 118

3.3.2.2.1 Porcentaje de apareamiento 118

3.3.2.2.2 Tiempo de cópula 120

3.3.2.2.3 Distribución espacial y temporal de los apareamientos 121

3.3.2.2.4 Análisis de esterilidad 123

3.4 Discusión 124

3.4.1 Experiencia de videograbación con material irradiado 124

3.4.2 Experiencias en jaulas de campo con material irradiado 126

CAPITULO IV: ***Análisis del desempeño en el apareamiento de una línea de sexado genético: en jaulas de campo y videograbaciones***

4.1 Introducción 131

4.1.1 Una nueva línea de sexado genético 131

4.1.2 Características de los leks 132

4.1.3 Cópula, inseminación y fertilización 135

4.1.4 Interacción macho-macho 138

4.2 Material y Métodos 140

4.2.1 Experiencia en jaulas de campo 140

4.2.2 Análisis de transferencia de esperma 141

4.2.3 Experiencia de videograbación 142

4.2.3.1 Experiencias unisexuales 142

4.2.3.2 Experiencias bisexuales 143

4.3 Resultados 144

4.3.1 Experiencia en jaulas de campo 144

4.3.1.1 Porcentaje de apareamiento 144

4.3.1.2 Tiempo de cópula 145

4.3.1.3 Distribución de las cópulas en la jaula 146

4.3.2 Análisis de transferencia de esperma 147

4.3.3 Experiencia de videograbación 148

4.3.3.1 Experiencia unisexual 148

4.3.3.2 Experiencia bisexual 160

4.4 Discusión 170

4.4.1 Experiencia en jaulas de campo 170

4.4.2 Experimento de videograbación 172

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Discusión general 177

Conclusiones 182

BIBLIOGRAFÍA 186

RESUMEN

La mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Wiedeman), constituye una de las plagas de los frutales de mayor importancia en el mundo por los graves perjuicios económicos que produce. En la actualidad la prosperidad de una región fruti-hortícola depende principalmente de que pueda ser declarada zona libre de la mosca del Mediterráneo.

Un método no contaminante para su control es la técnica del insecto estéril (TIE), este está siendo aplicado con éxito en algunas regiones de nuestro país. La eficiencia de esta técnica depende de la capacidad de los machos esterilizados, producidos por cría masiva, para aparearse en el campo con hembras salvajes. Por ello el análisis del comportamiento sexual de esta especie es fundamental para establecer controles de calidad de las líneas a ser utilizadas en la TIE.

El presente trabajo se refirió al análisis del comportamiento reproductivo y la selección sexual en la mosca del Mediterráneo. Se comparó el comportamiento reproductivo de líneas de cría masiva de *C. capitata* con el de las moscas salvajes. Asimismo se analizó el efecto que produce la radiación sobre dicho comportamiento. Esto se hizo en dos condiciones experimentales: a) En condiciones seminaturales por observación directa en jaulas de campo y b) En condiciones simuladas en laboratorio, por observación fina a través de videograbaciones.

Se verificaron diferencias entre líneas en cuanto al patrón de comportamiento en el cortejo. Los machos de laboratorio tendieron a usar menos tiempo que los salvajes en actividades que no conducen directamente a la cópula. Como consecuencia, hay una tendencia de las líneas de laboratorio a alcanzar la cópula antes que las salvajes en condiciones de laboratorio.

Por otro lado, se observó una disminución de la eficiencia de las moscas irradiadas en su capacidad para competir por el apareamiento tanto en laboratorio como en jaulas de campo.

ABSTRACT

The Mediterranean fruit fly (medfly), Ceratitis capitata (Wideman), is one of the most important world wide pest of commercial orchards, causing severe economical damages. Nowadays the prosperirty of a production areas is highly dependent of it could get the status of medfly free zone.

The sterile insect technique (SIT) is a non-contaminating method currently applied in Argentina for medfly control. The efficiency of this technique depends on the ability of mass-reared and sterilized males to mate wild females in the field. Consequently, the analysis of sexual behavior in this species is paramount to set quality control procedures to test the strains used in SIT programmes.

This work dealt with the analysis of mating behavior and sexual selection in the medfly. Mating behavior was compared between mass-reared strains and wild flies. Two experimental conditions were used: a) Semi-natural conditions, through direct observations in field cages, and b) laboratory simulated optimal conditions, through video-recording fine observations.

Differences in courtship behavior were verified between strains. Usually laboratory males spend less time in activities that do not lead to copulation than wild males do. Consequently, laboratory strains tend to reach copulation before than wild males in laboratory conditions. By contrast, the efficiency of radiation sterilized laboratory males is lower than that of wild males in laboratory and field cage conditions.

1. *Ceratitis capitata.* Características generales

Ceratitis capitata (Weidemann), comúnmente denominada mosca del Mediterráneo, es una de las especies de insectos de mayor importancia por los graves perjuicios económicos que produce, debido a los daños que produce en plantaciones de árboles frutales y hortalizas (Núñez-Bueno 1987).

C. capitata pertenece a la familia Tephritidae. Es un pequeño insecto de no más de 5mm de largo del cuerpo y de alas en delta con zonas de color naranja, pardo, negro, gris y blanco (Figura 1). El macho se distingue por sus setas espatuladas, localizadas en la cabeza sobre el borde superior de la órbita, y el abdomen terminal redondeado. La hembra exhibe un conspicuo ovipositor, con el que atraviesa el epicarpo de los frutos para depositar los huevos generando una abertura, estas favorecen la entrada y el posterior crecimiento de hongos y bacterias. Las cicatrices así originadas disminuyen las cualidades organolépticas de los productos y por lo tanto, su valor comercial. Por su parte las larvas generan galerías en la pulpa de la fruta al alimentarse, lo que lleva a la caída del fruto (Christenson y Foote 1960); todos estos daños directos originan severas pérdidas sobre la producción de frutas y hortalizas cultivadas (Núñez- Bueno 1987). Aunque el ovipositor no pueda atravesar la cáscara de algunos frutos, puede utilizar heridas o grietas en la misma (oviposición oportunista) (Quesada Allué et al. 1994). Un adulto vive aproximadamente 1 a 2 meses (Núñez Bueno 1987). Una hembra puede producir entre 300 y 400 huevos durante su vida, bajo condiciones de campo. Los dos sexos de *Ceratitis* son relativamente buenos voladores, habiéndose detectado moscas marcadas que se dispersaron con facilidad hasta a 2.5 km del lugar de liberación. Hay casos registrados de vuelo a grandes distancias (mas de 25 km) que incluyen la travesía

de extensiones de agua entre islas. Probablemente el viento ayude mucho en la dispersión (Christenson y Foote 1960; Maddison y Barlett 1989). Pero las moscas no solo dependen del viento para su dispersión a grandes distancias, también contribuye a ello las migraciones de larvas y pupas producidas por el hombre.

Los adultos de ambos sexos obtienen nutrientes de exudados de plantas y néctar, regurgitaciones, excrementos animales, bacterias y jugos de frutas y hongos (Christenson y Foote 1960; Mitchell y Saul 1990).

Figura 1. Macho (izquierda) y hembra (derecha) de *C. capitata* (de Manso y Lifschistz 1992)

2. Taxonomía de *Ceratitis capitata*

C. capitata pertenece al orden al Orden Diptera, y dentro de éste a la Familia Tephritidae. Esta familia se distribuye en áreas subtropicales y tropicales de todo el mundo, con más de 4000 especies (Christenson y Foote 1960). Se considera a los Tephrítidos como las "verdaderas" moscas de los frutos a pesar de que muchas especies sólo atacan las flores. Casi todas las especies son manchadas y multicolores. Las larvas de esta familia según la especie pueden alimentarse de diferentes partes de las plantas, salvo de las raíces (Quesada Allué et al. 1994). Dentro de Tephritidae se incluyen tres subfamilias: *Dacinae, Tephritinae, Trypetinae* (Drew 1989). El género *Ceratitis* (tribu Ceratitini, subtribu Ceratitina) pertenece a la subfamilia Dacinae junto con los géneros Dacus y Bactrocera. La subfamilia Trypetinae contiene, entre otros, a los géneros *Anastrepha* y *Rhagoletis* que atacan muchas frutas cultivadas. La subfamilia Tephritinae está particularmente asociada con flores y tallos de la familia de plantas Asteraceae. El reconocimiento de estas especies puede realizarse por medio de una clave moderna de clasificación de adultos propuesta por White y Elson-Harris (1992).

Se han descripto 78 especies pertenecientes al género *Ceratitis* (definido por Mac Leay), pero solamente 6 han sido reconocidas como plagas (Hancock 1984; White y Elson-Harris 1992). De ellas *C. capitata* es la mejor conocida y más importante. En la naturaleza, *C. capitata* compite con otras especies de moscas de la fruta, a veces desfavorablemente, como cuando comparte áreas con *Bactrocera dorsalis* (Christenson y Foote 1960).

3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *C. capitata* no difiere de los de otras especies de la familia Tephritidae (Nuñez Bueno 1987). El ciclo comienza después de la fecundación, cuando la hembra inserta los huevos dentro de la fruta. En el interior de ésta se produce el desarrollo embrionario y el postembrionario o etapas larvales. La larva se alimenta de la pulpa de la fruta.

Al igual que otros dípteros ciclórrafos, en *C. capitata* se reconocen tres estadíos larvales, cuyas larvas ápodas sucesivas se parecen entre sí pero difieren mucho del adulto. Al completar el tercer estadio, la larva salta, apartándose del alimento en busca de un lugar seco y una vez alcanzado éste se inmoviliza y empupa en el suelo. En este sentido *Ceratitis* es un caso único ya que no existe otro organismo ápodo y de cuerpo blando que sea capaz de saltar. El mecanismo de este salto fue estudiado en detalle por Maitland (1992). Esta forma de locomoción es muy eficiente, ya que con un solo salto, la larva recorre alrededor de 10 a 15 cm y por otra parte, la violencia del movimiento le permite a esta librarse eventualmente de otros insectos predadores en este momento tan vulnerable del ciclo de vida de la larva (Rabossi et al. 1994). Durante la pupación la cutícula larval se endurece y oscurece, formando una cubierta protectora llamada pupario. Dentro del mismo transcurren los estadíos sucesivos, prepupal, pupal y adulto farado. Los imagos emergen luego de 9 a 10 días (Núñez-Bueno 1987).

La duración de las distintas etapas del ciclo se afecta en forma significativa por la temperatura y humedad del ambiente (Shoukry y Afees 1979), lo que determina junto con la oportunidad de hospederos, el número de generaciones anuales de este insecto.

A 23°C en el laboratorio el ciclo de vida de *C. capitata* tiene una duración de 25 días desde la ovipuesta hasta la emergencia del imago. El desarrollo embrionario dura 52 hs, la etapa larval 264 hs y la etapa adentro del pupario 312 hs (Rabossi et al. 1994).

La longevidad del adulto difiere entre los sexos y depende de la temperatura, nutrición y actividad reproductiva (Carey et al. 1986, 1992, 1998; Rivnay 1950).

4. Origen y distribución

La importancia económica de algunos tefrítidos, plagas de los frutos, ha sido reconocida en todos los países de climas desde templados hasta subtropicales (Bateman 1972). *C. capitata*, originaria de Africa, es llamada vulgarmente "Mosca del Mediterráneo", debido a la zona de expansión durante el último siglo y medio. Ha sido la principal plaga de los frutales en muchos países, incluidos todos los americanos salvo Canadá (Maddison y Bartlett 1989). Los norteamericanos la bautizaron abreviadamente "Medfly" y así se la conoce en la literatura técnica de habla inglesa. Derivado de este apócope en algunos países latinoamericanos se la denomina "moscamed".

Esta especie ha sido capaz de invadir las regiones tropicales y subtropicales de los cinco continentes, con el agravante de no tener un huésped principal sino que, dependiendo de las condiciones ecológicas locales, puede llegar a infestar más de 200 diferentes especies de frutales y hortalizas. Su gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas, a las que no resisten otras especies de moscas de las frutas, la ha transformado en un enemigo de la agricultura sumamente peligrosos. En las últimas dos décadas, ha invadido regiones antes poco accesibles, debido al aumento del transporte aéreo y terrestre de productos vegetales y al intercambio turístico. En Sudamérica su

presencia se observó por primera vez en 1904 en Brasil y específicamente en Argentina hacia 1905. No obstante recién en 1937 fue declarada plaga en nuestro país (Vergani 1961), donde se distribuye en densidades variables, a lo largo de todas las regiones frutihortícolas. Históricamente las poblaciones de moscas no siempre ocuparon los actuales nichos ecológicos. La falta de hospedadores necesarios para depositar sus huevos induce a un desplazamiento hacia zonas habitualmente no infectadas, provocada por la producción de variedades tempranas de frutales (Manso y Lifschitz 1992).

En nuestro país se distribuye a lo largo de todo el territorio, aunque en el sur su presencia se ve limitada por las bajas temperaturas invernales y la escasez de plantas hospederas, siendo restringida su presencia en el norte y centro de la Patagonia (Aruani et al. 1996).

Junto con *Anastrepha fraterculus,* la mosca sudamericana, son las plagas económicamente más importantes de la fruticultura en el país (Vaccaro 1997). Estas dos especies no coinciden totalmente en su distribución pues *A. fraterculus* sólo se distribuye en el norte y centro del país, pero coexisten en la mayor parte de la distribución y comparten hospederos (SENASA 1997).

5. Hospederos e importancia como plaga

Se considera que el hospedero original de *C. capitata* fue *Agraria espinosa* (L.), pero durante su dispersión ha logrado infectar numerosas especies (Fimiani 1989; Christenson y Foote 1960). Por lo tanto, como *C. capitata* no se restringe a un solo hospedero, se la define como una especie generalista (o no especializada). Ataca cerca de 230 especies vegetales, entre cultivadas y salvajes. En Argentina los principales

hospederos son los frutas de carozo: durazno, damasco, ciruela, etc., pero también dañan higo, guayabas, naranja dulce, mandarina, kaki, membrillo manzana, pera y frutas finas y especies silvestres. Entre las especies hortícolas, las más frecuentes atacadas son los tomates y pimientos (Núñez-Bueno 1987).

El grado de intensidad del daño y preferencia de hospederas varía de un lugar a otro. Esta situación se atribuye a la condición de maduración de frutas de las hospederas presentes en una localidad determinada, y por lo tanto varía de un lugar a otro (Núñez-Bueno 1987).

En la actualidad, la prosperidad de una región frutícola depende principalmente de que pueda ser declarada zona libre de la mosca del Mediterráneo, puesto que, además de la disminución de la producción por los daños directos (15-20 % en Argentina), los países de mayor poder adquisitivo ponen severas restricciones a la importación de fruta que pudiera representar un riesgo desde el punto de vista fitosanitario (Aruani et al. 1996). Esto último ocasiona daños indirectos que se traducen en la imposibilidad de comercializar los productos al estado fresco en mercados con políticas cuarentenarias específicas para *C. capitata*. Los daños indirectos también incluyen el desaprovechamiento de las condiciones favorables que posee Argentina para la producción de frutas y hortalizas (SENASA 1997).

6. Métodos de control

En los programas de erradicación de insectos, el primer paso es determinar la extensión de la infestación (Mangel et al. 1984). Luego, el aislamiento de la región mediante un

sistema de barreras fitosanitarias, el control directo de la plaga, el control integrado y la extensión, capacitación y difusión.

El monitoreo incluye el trampeo de adultos y el muestreo de frutos. Las barreras *fitosanitarias* contemplan tres aspectos: 1- Embargos contra la introducción de materiales o productos que puedan ser portadores de moscas de los frutos en cualquier estado de desarrollo. 2- Inspección para detectar la presencia de tefrítidos en materiales o productos, 3- Tratamiento químico a cualquier tipo de vehículo en tránsito y a productos frutihortícolas en post cosecha.

El manejo integrado de la plaga (MIP) implementa estrategias en zonas de permanente infestación por tefrítidos, dirigidas a regular las poblaciones de organismos nocivos por debajo de niveles de infestación que produzcan pérdidas económicas, integra diversos métodos de control, procurando la menor perturbación del agroecosistema, y fundamentalmente evita la contaminación ambiental. El MIP contribuye a regular la plaga en aquellas regiones no incluidas en el programa específico de áreas libres.

La extensión consiste en encuentros de divulgación de los beneficios de la tecnología aplicada , con productores, asesores y profesionales del medio. La capacitación incluye la formación integral de los técnicos y auxiliares en lo que hace a los objetivos del programa y a su labor específica dentro del mismo, la difusión implica la comunicación de la problemática local o nacional en relación con las moscas de los frutos.

6.1 Control químico

A nivel mundial el método más generalizado de control es el uso de insecticidas. En la actualidad, la práctica más usual es el uso de insecticidas fosforados, preferentemente el malation. Estos se aplican como cebos alimentarios en base a hidratos de carbono como

la melaza de caña de azúcar o hidrolizados de proteínas. Esto está dirigido contra los adultos, tanto machos como hembras, por medio de aplicaciones terrestres y aéreas. Los insectos son atraídos por el cebo y al alimentarse con él mueren (Mitchell y Saul 1990; *Linares* y Valenzuela 1993)

Una práctica fundamental dentro del control químico es el trampeo de moscas adultas por medio de cebos con atrayentes específicos. *C. capitata* es atraída muy fuertemente por Siglure pero el Medlure resultó aún más efectivo. Estas trampas pueden no sólo ser usadas para monitoreo poblacional sino también para control, pues son tratadas con insecticidas fosforados DDVP de alta tensión de vapor (Picollo 1994).

Para pequeños huertos infectados se han recomendado los tratamientos de suelos como lo más práctico, seguro y efectivo, teniendo en cuenta lo vulnerable del 3° estadío larval y la pupa, como así mismo del adulto recién emergido (Stark et al. 1990). Sin embargo sólo los tratamientos de suelo con el fosforado diazinón han probado ser efectivos en el control de estadios inmaduros de *C. capitata* (Picollo 1994).

La mayoría de las especies plagas han desarrollado resistencia hacia los insecticidas usados para su control. Podemos considerar este fenómeno como una prueba más del proceso evolutivo, ya que la exposición al insecticida, actúa como una fuerza selectiva poderosa que concentra en la población factores genéticos preexistentes que confieren resistencia (Picollo 1994).

De acuerdo con este concepto evolutivo se ha definido a la resistencia como la capacidad desarrollada por una cepa de insectos para tolerar dosis de tóxicos letales para la mayoría de los individuos en una población normal de la misma especie (Picollo 1994). La velocidad de aparición de resistencia difiere según la especie o la población que está bajo la presión de selección. En el caso de *C. capitata,* a pesar de que no

existen casos documentados de aparición de resistencia en poblaciones naturales, la selección de líneas resistentes por presión con insecticidas en laboratorio provee evidencias de resistencia potencial hacia organofosforados, DDT y dieldrin (Picollo 1994). Por lo tanto es necesario realizar un control sistemático para detectar la potencial aparición de resistencia (Manso y Lifschitz 1992).

Además del efecto de desarrollo de resistencia, la amplia difusión de los nuevos pesticidas sintéticos y las altas dosis empleadas para tratar de eliminar la totalidad de los insectos presenta varias desventajas, desde el punto de vista económico. Los tratamientos sistemáticos aumentan significativamente los costos de producción y desde el punto de vista biológico, su uso intensivo desencadena modificaciones irreversibles. Por ejemplo, las modificaciones del equilibrio del ecosistema suelen ser negativas porque los insecticidas no son específicos para una especie y pueden perjudicar a insectos útiles como polinizadores y abejas mieleras. Por otra parte los insecticidas pueden provocar graves problemas a la salud humana, y consecuentemente hay una tendencia mundial hacia la restricción de los insecticidas químicos, favoreciendo los bioinsecticidas y métodos de lucha biológica o control genético (Manso y Lifschitz 1992). Se recurre al control químico en áreas de alta infestación para disminuir el nivel poblacional de la plaga y luego aplicar un método de control genético, también es utilizada en los focos de aparición de moscas en zonas donde ha sido erradicada.

6.2 Enemigos naturales y control biológico

En ambientes naturales factores como competencia interespecífica con especies relacionadas puede controlar su número. Por ejemplo en Hawai, Bactrocera *dorsalis*

tiene el hábito de depositar sus huevos en los orificios de oviposición hechos por la mosca del Mediterráneo, lo cual implica que las larvas de esta última sean incapaces de completar su desarrollo (Christenson y Foote 1960).

El control biológico consiste en la introducción de parasitoides y depredadores específicos de la plaga. En algunos casos los parasitoides pueden regular la población de moscas de la fruta. Los parasitoides usados hasta el momento atacan huevos o larvas y emergen de la pupa, pero no hay evaluaciones muy precisas sobre su eficiencia. Se han identificado varias especies de parasitoides de *C. capitata* a nivel de campo y laboratorio (Ver Núñez Bueno 1987).

En el noroeste argentino se identificaron dos especies de himenópteros como las más abundantes y las más frecuentes atacando a *C. capitata* en plantas hospederas (Ovruski et al. 1999). Proteger los huevos de los parasitoides de huevo (Bautista y Harris 1996) depende del comportamiento de la hembra de *C. capitata*, que debe esforzarse para ovipositar de manera de evitar enemigos potenciales. Luego de la emergencia las larvas son vulnerables a un número de parasitoides adaptados a buscar larvas y ovipositar en ellas (Greathead 1972; Wharton 1989; Headrick y Goeden 1996). Los parasitoides *Biosteres*, detectan las larvas por sus movimientos (Lawrence 1981), mientras otros como *Aganaspis* busca la larva por el agujero de entrada preexistente en la fruta (Ovruski 1994). Las pupas en el suelo, más indefensas, son vulnerables a parasitoides de pupa y predadores generalistas como hormigas y escarabajos (Wong et al. 1990; Ovruski 1995). Hay algunas evidencias que el desempeño de la larva puede afectar luego la susceptibilidad de las pupas a los parasitoides. Cuando pupas de *C. capitata* , criadas a diferentes densidades larvales, fueron expuestas al endoparasitoide de pupa, *Coptera occidentalis*, ocurrió un mayor porcentaje significativamente mayor de

parasitación en las pupas pequeñas (originadas de una mayor densidad larval) (Kazimirova y Vallo 1992).

Predadores como algunos hormigas, avispas, arañas, pájaros, sapos, salamanquesa atrapan moscas del Mediterráneo (Mitchell y Saul 1990). Los patógenos incluyen cepas virales (por ejemplo, *Rhaddovirus sigma*), bacterias (por ejemplo, *Bacillus thuringiensis*) y microsporidios (por ejemplo, *Nosema tephritidae*) han sido utilizados contra la mosca de la fruta en algunos casos (Mitchell y Saul 1990). No es posible bajar el nivel de infestación hasta los niveles requeridos utilizando solamente la introducción de parasitoides y predadores (Debouzie 1989). La cría y liberación de parasitoides contribuye sólo en algún porcentaje al control de esta plaga.

6.3 Control genético: Técnica del insecto estéril

La técnica del insecto estéril (TIE), propuesta por Knipling (1955), es un método de control genético sobre el que se está trabajando actualmente con gran interés para combatir a esta mosca, debido a su característica de ser no contaminante (Gilmore 1989). El mismo consiste en la liberación masiva de moscas, preferente sólo machos (Hendrichs et al. 1995), esterilizados producidos en criaderos que compiten con los salvajes por el apareamiento en el campo. Dado que el número de moscas liberadas es mucho mayor que el tamaño poblacional efectivo, la mayoría de los apareamientos de las moscas salvajes se produce con individuos estériles y, por lo tanto, resultan infértiles. La consecuencia es una reducción drástica de el tamaño poblacional en pocas generaciones.

Aunque la TIE se está implementando ampliamente, presenta distintos problemas metodológicos que han llevado a la necesidad de profundizar los aspectos de la biología

de esta especie relacionados con el comportamiento durante el cortejo, selección sexual y sistema de apareamiento. El éxito de este método depende del apareamiento entre los machos de cría masiva esterilizados y las hembras salvajes en el campo.

Existen evidencias de que las hembras liberadas esterilizadas, aunque no dejan descendencia ocasionan efectos perjudiciales reduciendo la eficacia de la TIE. Uno de los efectos negativos más conspicuos de la liberación de hembras es que "distraen" a los machos esterilizados apareándose con ellos. Además las hembras, aunque esterilizadas, mantienen su comportamiento de ovipositar sobre las frutas causando daños que posibilitan su posterior contaminación con hongos y bacterias que disminuye su valor comercial (Rössler 1982). Por ello, su eliminación en estados tempranos de su desarrollo (larva o pupa) es de gran interés en la implementación de programas de control en gran escala (McInnis et al. 1985). Esto además redunda en una apreciable reducción de los costos, ya que con las líneas salvajes se liberan millones de insectos de los cuales sólo la mitad son machos (Favret et al. 1995).

La TIE requiere se críen, esterilicen y posteriormente liberen en el área indicada cientos de millones de moscas. Para optimizar este método es importante estandarizar métodos de control de calidad de las líneas de cría masiva que se utilizarán para la erradicación de la plaga (Brazel 1986 et al.; Calkins 1989). Además, para la satisfactoria implementación de la TIE es de gran importancia que estos insectos compitan eficientemente por aparearse en el campo. Los procedimientos de control de calidad empleados durante los últimos diez años determinan atributos tales como viabilidad del huevo, porcentaje de pupación, peso de la pupa, habilidad de vuelo, longevidad, velocidad relativa de cópula, etc. Tales parámetros permiten obtener una visión general de la calidad del insecto a través de los eventos del proceso de cría. La colonización y

las condiciones no naturales utilizadas para la cría a gran escala, pueden presentar diferencias drásticas y rápida e intensa selección en el comportamiento sexual de poblaciones criadas artificialmente (Bush et al. 1976; Leppla et al. 1983). Se han desarrollado pruebas individuales para evaluar la calidad de los insectos criados masivamente (Chambers et al 1983). Sin embargo, la aplicación extensiva de la TIE contra las moscas de la fruta ha mostrado que estas pruebas requieren más refinamiento en el contexto de la teoría de la selección sexual (Burk y Calkins 1983). Aunado a toda esta metodología desarrollada para evaluar la calidad de los insectos producidos, debemos pensar que el producto final de la planta de cría masiva (insectario) es un organismo vivo con toda una inherente complejidad por lo que no podemos controlar su calidad con precisión. Para determinar los caracteres convenientes que deben tener las moscas criadas en el laboratorio necesitamos saber cuáles son las estrategias de apareamiento naturales usadas por la mosca de la fruta, qué caracteres o cualidades determinan la selección de pareja y cómo afectan esos caracteres a la selección. Un mejor conocimiento del comportamiento de los insectos a controlar y mejor entendimiento de los factores que afectan la selección sexual perfeccionará la eficiencia de la TIE (Liedo Fernández 1997).

7. Desarrollo de líneas de cría masiva, autosexado genético.

Como la proporción de sexos en la mayoría de los insectos es 1:1, la TIE convencional se realizaba liberando ambos sexos. Sin embargo las hembras que son criadas, irradiadas y liberadas junto con los machos no juegan un papel importante en la supresión de la población . Eliminar las hembras de alguno o todos estos procesos tiene

obviamente ventajas económicas. Esta ventaja aplicable a los programas de la TIE para todas las especies de insectos, representa sin embargo sólo parte de la historia y muchos más efectos positivos de la eliminación de las hembras aparecen cuando se considera cada especie de plaga de forma individual.

Desde hace algunos años se comenzaron a utilizar nuevas líneas de sexado genético (LSG) que permiten una separación temprana de sexos y liberación de machos solamente para el control de *C. capitata* utilizando la TIE. El uso de estas líneas ha tenido un gran impacto sobre la eficiencia global de este proceso porque ha incrementado significativamente la cantidad de esterilidad inducida en las poblaciones del campo. Las líneas de sexado genético están basadas en el uso de translocaciones cromosómicas entre autosomas y el cromosoma Y que permiten seleccionar genes marcadores para ser ligados al sexo masculino. Liberaciones a gran escala en el campo de moscas estériles claramente demuestran incrementos efectivos de una liberación de sólo machos comparado con una liberación bisexual.

El concepto de que líneas de sexado genético (LSG) pueden incrementar la eficiencia de la TIE fue primeramente sugerido hacia fines de los 60 (Whitten 1969) y se reconoció que el uso de la TIE para algunos vectores de pestes o enfermedades podría ser totalmente inapropiado sin remover las hembras antes de la liberación. Para muchos vectores de enfermedades por insectos, es la hembra la que transmite la enfermedad y aunque estériles pueden seguir actuando como vectores . En varias especies de *Amopheles*, se desarrollaron rápidamente LSG.

En otros insectos están disponibles distintos métodos, naturales o inducidos para manipular la proporción de sexos. En *Tetranychus urticae*, los machos pueden ser producidos por las hembras no apareadas y en algunos Lepidópteros y mosquitos

Culcine hay una gran diferencia en el tamaño de la pupa entre el macho y la hembra. Sin embargo en muchas especies no existen caracteres apropiados de dimorfismo sexual que permitan una separación mecánica, y tienen que desarrollarse nuevos sistemas, utilizando componentes genéticos específicos. En *C. capitata* se han desarrollado LSG que se han incorporado en programas de control en el campo. En esta especie hay accesibilidad a una infraestructura genética considerable. Sin embargo, la transformación de una LSG de un laboratorio experimental a un programa operacional de la TIE no es sencillo. Una LSG puede mostrar propiedades estables de sexado bajo condiciones experimentales, sin embargo una vez que la línea es transferida a una gran producción , tal vez 200 millones de insectos por semana, la LSG es sujeto a un nuevo grupo de restricciones. El modo en que la línea responda a tales restricciones no suele ser predecible. Tres programas de TIE control y erradicación de la mosca del Mediterráneo en Argentina (De Longo et al. 1999), Portugal (Pereira et al. 1999) y Guatemala (Cáceres et al. 1999), han cambiado de línea bisexual de cría masiva a LSG, con resultados muy positivos.

7.1 Componentes de LSG en C. capitata

Para aislar una línea de laboratorio de la mosca de la fruta con características de sexado genético se requieren dos componentes básicos: una línea con un marcador recesivo y una serie de líneas con translocaciones entre autosomas y el Y. La LSG puede ser sintetizada por el apareamiento del macho portador de la translocación, de fenotipo salvaje, con hembras de la línea selectiva marcada. Los machos de la F1 de esta cruza son luego retrocruzados con las hembras de la línea marcada y la progenie resultante produce una línea de sexado en la cual las hembras son homocigotas mutantes

fenotípicamente pero los machos son fenotípicamente salvajes, por ser heterocigotas y llevar una copia del alelo dominante del marcador. En principio ello es fácil al seleccionar como una combinación sin ningún conocimiento de la posición del marcador selectivo o el punto de ruptura de la translocación.

Desafortunadamente la experiencia ha mostrado que las líneas producidas en esta forma es muy poco probable que sean de uso práctico, porque al incorporarlas en la cría masiva fallan en mantener sus propiedades de sexado genético bajo las condiciones de producción a gran escala. Para sintetizar una LSG operacional, técnicas de análisis genético tales como mapas de deleciones y mapeo de puntos de ruptura de translocaciones, son necesarias para localizar muy precisamente la posición del gen marcador selectivo y el punto de ruptura de la translocación. Esta información de la posición es luego utilizada para elegir una combinación de marcadores y puntos de translocación que estén ubicados cercanamente reduciendo la probabilidad de entrecruzamiento genético, el cual podría conducir a inestabilidad.

7.2 Determinación del sexo en C. capitata

El desarrollo de una LSG, en cualquier especie, requiere un entendimiento del modelo de determinación sexual. *C. capitata* tiene 5 pares de autosomas y 1 par sexual, XX en las hembras y XY en los machos (Radu et al. 1975).

En esta especie el sexo está determinado completamente por la presencia o ausencia del cromosoma Y (Zapater y Robinson 1986; Zacharopoulou et al. 1991). El determinante del sexo está localizado en una muy pequeña región del cromosoma Y (Willhoeft y Franz 1996). Este modelo de determinación sexual se caracteriza porque cualquier

material genético asociado al cromosoma Y será inherente a todos los machos y no a las hembras.

7.3 Translocaciones del macho

El primer componente requerido para una LSG en la mosca del Mediterráneo es un conjunto de translocaciones en el macho. Estos rearreglos son fáciles de inducir, aislar y mantener. En los machos translocados una proporción de esperma porta duplicaciones y deficiencias, y la fertilización de oocitos normales con tales espermatozoides produce cigotas que mueren como embriones y reducen la eclosión de huevos un 50%. Esto significa que una LSG tiene una fertilidad del 50% comparada con una línea bisexual. Dependiendo de la topología particular de la translocación, algunas de las cigotas pueden llevar duplicaciones y deficiencias que pueden formar larvas o pupas o adultos viables, sin embargo más tarde estos son subnormales en fertilidad o viabilidad. La supervivencia de estas cigotas hasta estados avanzados del desarrollo pueden tener importantes consecuencias para la cría masiva de una LSG y para la interpretación de datos de control de calidad.

7.4 Inducción y aislamiento

La radiación, con rayos gamma o X, induce rupturas cromosómicas y ello es utilizado para inducir translocaciones. Como los puntos de ruptura cromosómicos son inducidos al azar la translocación apropiada puede sólo ser aislada luego de un proceso de selección. Machos sexualmente maduros o pupas en estado avanzado de desarrollo son irradiados y los machos apareados en masa con hembras vírgenes. Los machos de la F1 son luego apareados individualmente con hembras vírgenes y los machos translocados

son seleccionados por un monitoreo de fertilidad donde se seleccionan líneas en las cuales solo los machos tienen reducida su fertilidad o con el uso de "seudo-ligamiento" del gen marcador seleccionado al cromosoma Y.

Todos los estudios de inducción fueron llevados a cabo con una amplitud de variación de 15Gy a 50Gy (Franz y Kerremans 1993).

Dos genes seleccionados han sido incorporados en líneas de sexado funcionales, "white pupa" o pupa blanca (*wp*), que permite diferenciar pupas de macho y hembra en base al color, y un letal condicional termosensible o "temperature sensitive lethal" (*tsl*), que determina que las hembras mueran por un incremento en la temperatura ambiente en el estadio de huevo (Franz et al. 1996).

La cepa portadora de *tsl* también tiene la mutación *wp* en el mismo cromosoma. Los individuos homocigotas para *tsl* pueden eliminatrse mediante la exposición de los huevos a 33-34°C (Franz y Kerremans 1996).

7.5 Genes separadores de sexos

Estos genes pueden ser utilizados para generar diferencias morfológicas entre machos y hembras. Entre ellos pueden destacarse:

- *wp* fue encontrado en poblaciones salvajes de C. capitata y descripto por Rössler (1979a). Es una mutación recesiva la cual cambia el color de la pupa de marrón a blanco. Se encuentra en el cromosoma 5.

- "dark pupa" o pupa oscura (*dp*) (Rössler y Koltin 1976) fue el primer gen utilizado en la mosca del Mediterráneo para la síntesis de una LSG (Rössler 1979b). En contraste con *wp* la cutícula de los individuos *dp/dp* es mucho más dura que la de tipo salvaje. Se encuentra en el autosoma 3.

-desarrollo lento o "slow" (*sw*), la mutación causa uno o dos días de retraso en el desarrollo (Cladera 1995). Tiene un efecto pleitrópico sobre el fenotipo de los ojos, produciendo un color escarlata oscuro con disminución de la iridiscencia. Mapea en el cromosoma 2.

-niger (*nig*) es una mutación la cual oscurece el color de la cutícula y los individuos nig/nigpueden ser distinguidos del tipo salvaje en los estadios de larva, pupa y adulto. La mutación mapea en el cromosoma 2.

7.6 Recombinación en machos

Durante mucho tiempo se consideraba que en los machos de *C. capitata* no ocurría recombinación (Cladera 1981; Rössler 1982). Sin embargo Rössler (1982) encontró en la progenie de machos que llevan una translocación un número significativo de recombinaciones, aunque con una frecuencia 90-95% menor que en las hembras.

La contaminación y la recombinación durante la cría masiva pueden tener efectos negativos similares sobre la eficiencia del sexado de una LSG, los que conducen a la inestabilidad de las líneas.

7.7 Utilización de LSG en la TIE

En la actualidad de utilizan tres LSG cuyos requerimientos para la cría masiva han sido investigados en detalle: una línea de pupa blanca (*wp*) denominada Seib-6-96 y dos líneas *tsl*, Viena 4/Tol-94 y Viena 6-96. La Seib-6-96 es criada en la planta de cría masiva en la provincia de Mendoza, Argentina desde 1996 (DeLongo et al. 1999). Actualmente se están haciendo estudios para reemplazarla por la Viena 6-96. La Viena 4/Tol-94 es criada en forma masiva en Guatemala (Fisher y Caceres 1999).

8. Situación del control de la plaga

A causa de los enormes perjuicios económicos que ocasionan las explosiones poblacionales de este díptero, se han establecido numerosa barreras fitosanitarias entre países y regiones y se organizan continuamente multimillonarias campañas de erradicación. Prácticamente cualquier fruta de países afectados por la plaga tiene impedido el ingreso a la mayoría de aquellos que la han erradicado. Ante la duda, la fruta siempre es sujeta a severas cuarentenas. El afán de erigir barreras de protección ha llegado incluso, a provocar incidentes entre gobiernos regionales y a veces entre países. Las campañas de eliminación por medio de insecticidas (cebos tóxicos), de lucha biológica por medio de la TIE (en áreas reducidas) y de censos y localización por medio de trampas, han provocado gastos ingentes a gobiernos locales, regionales y nacionales; así como a organizaciones internacionales, entre las que se destacan la OEA y la IAEA, la agencia internacional para la Energía Atómica, con sede en Viena.

Los tratamientos cuarentenarios tienen altos costos y reducen el tiempo de fruta en los anaqueles.

9. Situación actual del Programa Nacional de Moscas de los Frutos (PROCEM) en Argentina.

En 1994 la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca aprueba el Programa Nacional de Control y Erradicación de la Mosca de los Frutos (PROCEM), en el cual intervienen organismos oficiales nacionales, gobiernos provinciales, universidades y asociaciones de productores. El programa contó con el apoyo de suma importancia brindado por el

Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA) y FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation), con consultorías técnicas, equipamientos y capacitación del personal (SENASA 1999).

De acuerdo a las regiones agroecológicas y al status de la plaga el país se subdividió en cinco regiones donde se están llevando a cabo los siguientes subprogramas PROCEM: Patagonia, Mendoza, San Juan, La Rioja, Litoral (Proyecto U.E- MERCOSUR SENASA 1999)

La estrategia de erradicación del PROCEM está basada en manejo integrado de la plaga, incluyendo la TIE. La provisión del insumo crítico para la TIE, las moscas esterilizadas, la brindan dos insectarios que existen en el país, el de la provincia de Mendoza que alcanzó una producción de 300 millones de machos estériles por semana y el de la provincia de San Juan que aporta 8 millones de insectos estériles por semana. Complementariamente Chile a través de su insectario situado en Arica, aporta 17 millones de pupas estériles por semana que se destinan al programa de erradicación que se lleva adelante en la provincia de San Juan (SENASA, 1999). De esta forma se alcanza una superficie bajo la TIE de aproximadamente 386.800 has. Además de los sistemas de detección y el componente de control, se implementó un sistema cuarentenario para proteger las áreas que se encuentran bajo acciones de control. El Sistema Cuarentenario cuenta con 23 puestos de control fitosanitarios y 11 centros de fumigaciones con Bromuro de Metilo. El sistema cuarentenario está avalado por normas que fijan las condiciones que requieren las partidas de frutas para ingresar a zonas protegidas y las mismas están en proceso de actualización (SENASA 1999).

Gracias a los planes de control nuestro país ha logrado que en 1999 los Valles Andinos Patagónicos fueran reconocidos como área libre de mosca (SENASA 1999). En la

provincia de Mendoza se alcanzó un significativo nivel de supresión de la plaga. En San Juan se concretó la remodelación y ampliación del insectario que alcanzará una producción de 80 millones de pupas bisexuales semanales.En La Rioja se completó la red de monitoreo, se instalaron puestos cuarentenarios y se realizaron tratamientos aéreos de aplicación de cebos tóxicos con un muy alto porcentaje de control sobre la plaga.

En la actualidad existe un Proyecto MERCOSUR U.E (SENASA 1999) que incluye a Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay que prevé el combate de la plaga en el área de producción citrícola de la región del litoral.

10. Teoría de la selección sexual

Darwin (1871), definió el proceso de selección sexual expresando que *"ésta depende de las ventajas que algunos individuos tienen sobre otros del mismo sexo y especie únicamente en relación a la reproducción"*.

La selección sexual tiene un número de subcomponentes pero generalmente se reconocen dos tipos mayores de competencia. Uno depende de la elección de un individuo por otro del sexo opuesto, por ejemplo la elección por parte de una hembra de un macho dentro de un grupo de machos. Esta selección ha sido denominada epigámica o selección intersexual. El otro se basa en las interacciones entre machos, o menos comúnmente entre hembras y se le denomina selección intrasexual (Partridge y Halliday 1984). Hoy se acepta que los dos procesos de los que habló Darwin actúan en las poblaciones y existen pruebas experimentales de que las hembras de algunas especies son capaces de elegir entre los machos (Kirkpatrick 1987). Como Halliday (1983)

señala, no siempre es fácil determinar cuál forma de selección ha sido la más importante para algún carácter particular. Ambos procesos pueden actuar simultáneamente durante el cortejo y suele ser muy difícil diferenciar el papel que juega cada uno de ellos.

Existe selección sexual en aves y mamíferos (Le Boeuf 1974; Cox y Le Boeuf 1977; Andersson 1982) y también en batracios peces insectos y arácnidos (Searcy 1982; Kirkpatrick 1987)

Según Fisher (1930), para que la selección sexual basada en la preferencia por parte de la hembra produzca la evolución de un carácter dimórfico que se exprese sólo en los machos, el individuo que ejerce la preferencia ha de obtener alguna ventaja. Existe así un proceso en el que la atractividad del macho y la preferencia de la hembra evolucionan conjuntamente. El proceso se detendrá cuando la ventaja que posea el carácter en relación a la selección sexual se vea contrarrestada por su desventaja en otros componentes de la eficacia biológica (viabilidad, longevidad, etc.). Este proceso se conoce con el nombre de "runaway".

Trivers (1972) propuso que la selección sexual ocurre a causa de la desigualdad en la inversión parental (consumo energético) por progenie entre los sexos. Cualquier sexo que haga la inversión parental más grande por progenie (usualmente la hembra), será un recurso limitado y valioso para el otro. Según Emlen y Oring (1977) el sistema de apareamiento de una especie está determinado por la disparidad entre los sexos en inversión parental, la relación de machos a hembras disponibles por apareamiento en cualquier momento (referido como la relación operacional de sexos) y otros factores ecológicos, tales como la depredación, la distribución de comida y otros recursos críticos, la duración de la temporada de reproducción y los requerimientos de los hijos. Estas variables limitan la capacidad de machos para monopolizar un número de hembras

o recursos y la capacidad de las hembras para escoger entre parejas potenciales. El resultado es una extensa variedad de sistemas de apareamiento.

11. Sistema de apareamiento

Por sistema de apareamiento se entiende el conjunto de estrategias, comportamientos y adaptaciones fisiológicas que se observan en una especie con el fin de reproducirse (Vehrencamp y Bradbury 1984). Uno de los sistemas más extremosos de apareamiento conocido es el lek polígamo, el mismo es una agregación de machos que realizan despliegues a las que concurren hembras con el sólo propósito de copular (Bradbury y Gibson 1983).

Estas agregaciones de machos han sido llamadas lek (derivado de la palabra sueca que quiere decir "jugar") (Trail 1983). Las hembras típicamente visitan una variedad de machos, se aparean con uno y siguen su camino. Algunas características generales del sistema de apareamiento de lek son: receptividad sexual de hembras desincronizada, una relación sexual operacional fuertemente sesgada y una larga temporada de reproducción. Usualmente en leks, una pequeña proporción de los machos representa una alta proporción de las cópulas. El comportamiento del lek ha sido comprobado para pájaros, peces, ranas, murciélagos, antílopes e insectos. Las moscas de la fruta están entre los insectos que muestran este sistema de apareamiento por lek (Emlen y Oring; 1977; Bradbury 1981; Burk 1981).

Cualquier cuidado parental es intentado solamente por las hembras, y los machos ni defienden recursos ni parejas. En lugar de esto los machos se agregan y establecen territorios donde ellos se muestren a las hembras.

Emlen y Oring (1977), sugiere que el sistema de lek se produce cuando los recursos son superabundantes, imprevisibles en tiempo y espacio (no son defendibles por el macho) o muy difícil de defender porque la densidad poblacional es alta (interferencia con otros machos).

En especies con leks el único beneficio que podría recibir las hembras son "buenos genes". Si existe selección intensa sobre algún carácter de los machos, sería esperable que disminuya la varianza genética aditiva de dichos caracteres. Por lo tanto, en el largo plazo, las hembras no van a tener variabilidad para elegir. Esta es la llamada "paradoja del lek" (Moller 1994).

Las principales hipótesis que han sido propuestas para explicar la evolución del lek (Hoglung y Atalano 1995) son:

1- Los machos se agregan en "hotspots": los machos se agregan en áreas donde la tasa de encuentro con las hembras es mayor, zonas donde se superpone los rangos de distribución de las hembras, así los machos pueden obtener un incremento en la probabilidad de visita de la hembra.

2- Los machos se agregan alrededor de "hotshots": si los machos difieren en calidad y ciertos machos son altamente atractivos para las hembras (hotshots), los machos de más baja calidad pueden incrementar su probabilidad de apareamiento por ubicarse alrededor de los machos más atractivos (hotshots).

3- Preferencia de la hembra: Las hembras pueden preferir aparearse en agrupaciones de machos debido a que obtienen ciertos beneficios, como disminución de la predación, oportunidad de comparar machos, incremento en la calidad promedio de los machos.

4- Efecto de dilución: los machos se agregan para disminuir la predación, si los machos se exponen a la predación durante el despligue sexual, el riesgo per cápita decrece con el incremento del tamaño del grupo, luego la selección favorecerá la agregación.

De acuerdo con Bradbury (1981), ninguno de estas hipótesis son enteramente satisfactorios y probablemente estas no son mutuamente excluyentes.

12. Comportamiento sexual en moscas de la fruta

Prokopy (1980) y Burk (1981) identificaron dos tipos generales de sistemas de apareamientos:

1. El que se presenta en los géneros univoltinos de clima templado (por ejemplo *Rhagoletis*) cuyas poblaciones y hospederos son bastante predecibles y estables en distribución y abundancia año con año. En este caso, el sitio de encuentro cambia estacionalmente en la planta hospedera de acuerdo con el grado de madurez de la fruta y la receptividad de las hembras, del follaje (no basado en el recurso) al sitio de oviposición (basado en el recurso) donde los machos intentan forzar la cópula con hembras no receptivas.
2. El que se presenta en géneros tropicales y subtropicales (por ejemplo *Anastrepha, Ceratitis, Dacus*), cuyas poblaciones son multivoltinas y tienden a tener una gama amplia de hospederos con distribución y abundancia sumamente irregular en espacio y tiempo. Aquí los sitios de encuentro de apareamiento son correspondientemente más predecibles y más variables. Debido a que las hembras o los recursos requeridos por ellas no son económicamente monopolizables, los machos forman agregaciones no basadas en los recursos (leks) en las cuales ellos

establecen pequeños territorios que consisten de una sola hoja donde luchan unos contra otros mostrando despliegues sexuales y se aparean con las hembras que llegan.

Varios autores han examinado el proceso por el cual se forma un lek (Prokopy 1980; Aluja et al. 1983; Arita y Kaneshiro 1985; Iwahashi y Majima 1986). Un macho puede empezar señalando y llamando en sitios con condiciones ambientales especiales a una hora específico del día. Luego, machos adicionales son atraídos a dichos lugares. Usualmente los leks consisten en 3 a 10 machos agrupados agrupados en un área de 30 cm aproximadamente, cada uno en una hoja separada. Las interacciones macho-macho ocurren estableciendo y defendiendo su territorio individual (competencia intrasexual). Más tarde las hembras son atraídas al lek. Estas permanecen en la periferia y hacen visitas a los territorios individuales.

Normalmente cuando llega la hembra el macho está en el proceso de producción de feromona, llamando y/o abanicando las alas. Después de llegar, la hembra se aproxima finalmente al macho. Cuando la pareja se ha acercado hasta 1-2 cm uno del otro, el macho se ocupa en abanicar las alas e intenta copular. Normalmente el apareamiento tiene lugar en la superficie inferior de la hoja que es el territorio del macho (Prokopy y Hendrichs 1979; Aluja et al. 1983; Burk 1983; Morgante et al. 1983; Kuba et al. 1984). Las parejas que copulan dentro del lek regularmente son molestadas ahí por otros machos. Por consiguiente, después de iniciar el apareamiento se mueven en dirección a lugares más protegidos (Kuba y Koyama 1985; Hendrichs 1986).

Field et al. (1999), reconocen la existencia de leks en dos escalas espaciales en *C. capitata*, los "leks en pequeña escala", como la definió Prokopy y Hendrichs (1979) agrupaciones de 3 a 6 machos "llamando" dentro de la copa de un árbol, y los leks a

gran escala definido por Whittier et al. (1992) agrupaciones de los machos "llamando" entre árboles. A gran escala una combinación de factores ecológicos parecen actuar dirigiendo la actividad de apareamiento de la mosca del Mediterráneo primeramente hacia la fruta hospedero, y luego a concentrarse en ciertos árboles dentro del hábitat. Hay evidencias que sugieren un efecto compuesto de la agrupación a gran escala, evitar la predación y agregarse en "hotspot". Hay razones para suponer que los efectos de preferencia de la hembra y "hotshot" no podrían ser fuerzas evolutivas potentes en este nivel espacial (Field et al 1999).

Las causas evolutivas del lek a pequeña escala dentro del árbol parecen ser distintas de aquellas que favorecen los leks a gran escala. El efecto de hotspot en este caso es de poca importancia, mientras que los efectos de evitar la predación, "hotshot" y preferencia de la hembra podrían ser importantes. Sin embargo aún no hay evidencias directas disponibles que soporten la hipótesis de "hotspot". La evidencia es tal vez convincente por el efecto de predación que actúa al incrementar el tamaño de la agregación. La evidencia también existe por la preferencia de la hembra de agregaciones de gran tamaño, sin embargo esto parece ser modulado por el peligro de predación, punto que lleva a un conflicto de interés entre los sexos con respecto al tamaño del lek (Field et al. 1999).

12.1 Estímulos

Una de las características principales de un sistema de apareamiento no basado en el dominio de un recurso, que permite los encuentros sexuales lejos de los recursos, es la existencia de señales para atraer y comunicarse con el sexo opuesto. De acuerdo con

Burk (1981), las señales más elaboradas en el comportamiento sexual de insectos se encuentran en Diptera.

En las moscas de la fruta, las señales más observadas son producidas por machos y usadas en un contexto sexual. El cuerpo de estas moscas es colorido y refringente y sus alas transparentes son marcadas con patrones distintivos. Las diferentes posiciones y movimientos de alas y patas, probablemente son señales que proveen información acerca de la especie, sexo y otras características individuales del emisor (macho) (Burk 1981). Sin embargo esto no ha sido demostrado experimentalmente.

Webb et al. (1983a, 1983b) y Sivinski et al. (1984) han demostrado diferentes señales acústicas, cada una con distintas características y patrones de intensidad, las cuales son producidas por la vibración de las alas. Las señales acústicas ocurren cuando se están emitiendo feromonas, peleando con otros machos, cortejando hembras, antes de la cópula y después de la iniciación.

La comunicación química en dípteros no es tan eficiente como en lepidópteros. Sin embargo se han identificado feromonas en un número de especies (Chambers 1977). En varias especies los machos producen atrayentes de mediana a larga distancia que se dispersan desde una cavidad al final del abdomen que se distiende cuando los machos están llamando (Nation 1981). Los machos adoptando su postura "inflada" ondulan sus alas abanicándolas rápidamente, rotando alrededor y frecuentemente, tocando la superficie de la hoja con el extremo del abdomen, aparentemente para depositar su feromona sexual y aumentar el área efectiva de la evaporación de la misma (Prokopy y Hendrichs 1979).

Varios autores han comunicado que las trampas cebadas con machos o atrayentes sintéticos atraen más machos que hembras (Perdomo et al. 1976; Chambers 1977). De

acuerdo con Burk y Calkins (1983) esta situación puede ocurrir porque los machos maduros sexualmente deben localizar un lek todos los días mientras una hembra solamente va al lek una o pocas veces en su vida.

12.2 Competencia Intrasexual

Existe evidencia empírica que indica que los machos victoriosos una pelea ven incrementado su éxito en el apareamiento (Partridge y Halliday, 1984). El tamaño corporal puede a veces relacionarse con este hecho (Churchill-Stanland et al. 1986, Burk 1991). La selección intrasexual no actúa solamente sobre caracteres relacionados con la competencia a través de peleas previas a la cópula. Existen otras vías competitivas como ser el nivel de actividad general (Partridge et al. 1987a), la capacidad de interferir y desplazar a un macho que se encuentra copulando y acaparar a esa hembra o la remoción de esperma ya transferido por otro macho a la hembra previo a la propia transferencia durante la cópula (Waage 1979).

Una vez que se ha integrado un lek, los aspectos principales de competencia intrasexual implican interacciones agresivas entre machos por territorios de una sola hoja. Desde estos territorios, los machos compiten por atraer a las hembras a través de señales y despliegues. Dodson (1982) describe despliegues agresivos estereotipados y confrontaciones físicas reales en *Anastrepha suspensa.* Observando el comportamiento de lek de la misma especie bajo condiciones naturales, Burk (1983) encontró que a los machos residentes les fue más fácil ganar un territorio peleando con los intrusos y los machos grandes fueron mejores que los pequeños defendiendo territorios. Hay varias descripciones de lucha territorial dentro de los dípteros que muestran ventajas del tamaño grande y/o efectos de residencia (Alcock y Pyle 1979; Partridge et al. 1987).

Burk y Webb (1983) mostraron que las hembras de *A. suspensa* pueden detectar diferencias en el tamaño de los machos por medio de parámetros acústicos, por lo que es posible que los machos usen esta información acústica en combinación con los despliegues para evaluar el tamaño del oponente. De esta forma los machos evitarán los costos que están implicados en peleas reales. Aún cuando las moscas de la fruta, como otros dípteros, no han desarrollado ninguna defensa especial, las peleas pueden resultar costosas. Por ejemplo un macho con las alas dañadas como resultado de una pelea, posiblemente no pueda atraer a muchas hembras con su reducido llamado acústico (Sivinski y Webb 1985).

La presencia de selección sexual relacionada con caracteres morfológicos ha sido observada en distintas especies de dípteros incluyendo a *C. capitata* (Churchill-Stanland et al. 1986).

Por su puesto, además de tamaño y efecto de residencia, hay otros aspectos que implican que aumente la complejidad de los encuentros territoriales. Capy y Lachaise (1986) encontraron en *Drosophila melanogaster* que la edad puede ser un factor importante.

En *C. capitata* se han registrado intentos de apareamiento entre machos (Prokopy y Hendrichs 1979). La importancia y significado de este comportamiento aun no está claro.

Otra forma de interacción entre machos en un lek se relaciona con una estimulación para llamar y liberar feromona. McDonald (1987) encontró que los machos de *C. capitata* se estimulan uno a otro para lograr un alto nivel de feromona liberada y se requiere de una estimulación continua para mantener estos niveles altos.

Una cópula segura es el objetivo final del comportamiento del macho. Sin embargo, la cópula no garantiza que un macho fertilizará a su pareja. De acuerdo con Parker (1970), en la mayoría de especies de insectos el último macho en copular con una hembra, antes de que ella ponga sus huevos, usualmente es el que gana la competencia de esperma. Sin embargo, *Drosophila sp.* y *C. capitata* parecen ser la excepción, ya que el esperma de dos copulaciones muestra un cierto grado de mezcla (Sivinski 1980). Las hembras de *C. capitata* no muestran atracción a la feromona sexual de los machos después del apareamiento y ellas generalmente se aparean generalmente una vez en su vida, lo que sugiere que la cantidad de esperma que un macho pueda eyacular cuando insemina a la hembra es importante en la competencia de esperma (Nakagawa et al. 1971). Sin embargo se ha demostrado una cierta proporción de reapareamientos (Hendrichs et al. 1996).

12.3 Elección de pareja

La elección de pareja es uno de los tópicos más controvertidos en la literatura de selección sexual (Halliday 1983). Generalmente se acepta que un individuo reducirá la aptitud de su propia descendencia si copula con una pareja de "baja calidad". En varios sistemas de apareamiento, las hembras suelen seleccionar sus parejas sobre la base de beneficios materiales tales como recursos alimenticios (ej. poliginia por defensa de recursos (Cronin y Shernan 1976)). Burk y Calkins (1983) sostienen que ya que el único provecho que las hembras, de especies que forman leks, pueden obtener es genético y que ellas normalmente copulan una sola vez en su vida, tienen que ser muy selectivas y evaluar un número de características de los machos.

La evidencia directa sobre elección genética de la pareja es escasa. Partridge (1980) estableció una correlación entre elección de pareja y descendencia apta. Ella permitió a hembras de *Drosophila* aparearse libremente o forzó a cada hembra para aparearse con un compañero seleccionado al azar. Encontró que la descendencia del grupo que podría elegir era ligera, pero consistentemente mejor en los experimentos de competencia larval que aquélla del grupo que no podía escoger. Sin embargo Boake (1986), trabajando con el escarabajo de harina *Tribolium casteaneum*, no encontró correlación entre la atractividad de los machos y la viabilidad de la descendencia. Ella concluyó que la hipótesis de selección por "buenos genes" requiere probarse en una variedad de especies antes de que se pueda derivar una conclusión general.

Otra pregunta en relación con la elección de pareja es si la hembra selecciona al macho en sí o al territorio. Bradbury y Gibson (1983) señalan que las nociones ampliamente aceptadas de que las hembras simplemente escogen el macho central en un lek o que las hembras siempre escogen el macho "dominante" no se puede asegurar por los datos disponibles a la fecha. Por lo tanto ellos concluyen que nadie ha identificado las claves críticas usadas por las hembras en la elección dentro de un lek. No obstante Padtridge y colaboradores (1987b) encontraron que los machos grandes de *Drosophila melanogaster* fueron más exitosos para copular.

Lo que puede afirmarse es que las agregaciones de machos permiten a las hembras una mayor posibilidad de ejercer la elección de su pareja (Burk 1983). También resulta más fácil para una hembra detectar a los machos en esas agregaciones debido a que las señales se unen (Emlen y Oring 1977). Las hembras reducirán su gasto de energía y riesgo de depredación reduciendo el número de lugares visitados. Los encuentros territoriales entre machos reducirá el tiempo que una hembra necesita para localizar los

"mejores" machos o los "más débiles". Generalmente los machos en agregaciones tienen más y mejores apareamientos exitosos que cuando se muestran en posiciones aisladas (Prokopy y Roitberg 1984; Hendrichs 1986). Se ha sugerido que los machos *que se* muestran en grupos tienen un efecto de estimulación más fuerte en las hembras y por lo tanto obtienen más parejas que machos que se muestran solos. Sin embargo, esta hipótesis no explica porqué los despliegues en grupo tienen un efecto de estimulación en hembras de lek pero no de hembras de especies que no forman leks. Así pues, puede especularse que la tendencia a agregarse parece ser resultado del comportamiento de la hembra.

La elección de la pareja en función de la frecuencia o la ventaja del "macho raro" podría ser una adaptación en hembras para evitar producir depresión genética y asegurar una mayor heterocigosidad en su descendencia (Vehrencamp y Bradbury 1984). Esto podría ser una importante adaptación para especies que viven en ambientes inciertos y temporales, como lo son las frutas tropicales para moscas de la fruta. Dal-Molin (1978) encontró en *Drosophila melanogaster* que las hembras prefieren machos provenientes de otros hospederos. Sin embargo, el efecto del "macho raro" no ha sido registrado para moscas de la fruta (tefrítidos).

12.4 Estrategias alternativas del macho

Es ampliamente aceptado que la diversidad intraespecífica en el comportamiento puede ser completamente adaptable y mantenida por selección natural. En el caso de selección sexual, muchas de las alternativas usadas por los machos parecen ser menos eficientes que el comportamiento "normal". Sin embargo, en muchos casos las diferentes

alternativas adoptadas resultan en un balance entre las estrategias de alto beneficio/bajo riesgo (Emlen y Oring 1977).

Las formas de apareamiento alternativas en tefrítidos fueron resumidas por Prokopy *(1980)*. Hendrichs (1986) encontró que solamente machos de *A. suspensa*, con posibilidades muy reducidas de apareamiento en la forma primaria de reproducción, utilizaron estrategias secundarias. En estos casos los machos trataron de tomar control de la decisión de apareamiento en una forma más indiscriminada, ya sea "parasitando" las agregaciones de machos (visitantes satélites), o buscando hembras no receptivas, en frutas cuando estaban tratando de ovipositar (apareamiento forzado). Prokopy y Hendrichs (1979) encontraron que cuando el número de hembras de *C. capitata* fue reducido en la jaula de campo, aumentó el número de machos que adoptaron estrategias alternativas. De este modo, estas estrategias pueden ser parte de una actividad diaria practicada por todos los machos cuando la densidad de hembras es baja, o simplemente un último recurso de machos rechazados en los leks.

12.5 Comparación de moscas criadas en el laboratorio y salvajes

La competitividad por el apareamiento en el campo de los insectos criados y esterilizados en forma masiva es quizá el factor más importante para el éxito de un programa de TIE. Conocer los posibles efectos dañinos de la radiación ionizada usada para esterilizar (Knipling 1979) y los efectos de la cría masiva sobre la competitividad sexual es muy importante para la eficiencia de la técnica.

Koyama et al. (1986) comunicó que cepas silvestres y de laboratorio de *Dacus cucurbitae* se aparearon al azar cuando fueron confinadas en una jaula de campo y no hubo evidencia de aislamiento sexual entre las mismas. Zapien et al. (1983) encontraron

que los machos de laboratorio de *C. capitata* compitieron con los machos de campo por territorios en jaulas de campo con árboles de café, formando leks mixtos y los machos de laboratorio dieron cuenta del 51.5% de todas las cópulas. Sin embargo cuando se consideraron solo las hembras de campo, los machos de laboratorio representaron solamente el 38% de las cópulas. Estos resultados indican que los machos de laboratorio no han perdido su comportamiento "natural", pero las hembras de laboratorio parecen ser menos selectivas que las hembras de campo. Por lo tanto siendo más selectivas, las hembras de campo tienden a preferir más a los machos de campo (Cayol et al.1999).

Este comportamiento, como obviamente se deduce, puede influir fuertemente en la efectividad de la TIE. Un ejemplo interesante es el caso de una prueba piloto que se realizó en Hawaii para erradicar la mosca de la fruta de las plantaciones de café, aplicando la TIE (McInnis et al. 1996). El programa falló después de varios años de continuas liberaciones, y se postuló que la causa era que las hembras salvajes del área tratada en Kauai alteraron su preferencia de apareamiento y comenzaron a rechazar más a los machos de laboratorio durante el cortejo (McInnis et al. 1996). Esto podría a través de un proceso de selección sexual dado que el éxito reproductivo de una hembra que se aparee solamente con un macho estéril es cero, se perpetuarán a través de sus descendientes sólo aquellas hembras que discriminen en forma correcta entre machos de cría masiva y machos salvajes. La presencia de bases genéticas para la discriminación podría llevar a la selección de hembras que rechacen a los machos irradiados (McInnis et al., 1996).

En *A. suspensa* de campo y de laboratorio regularmente forman leks mixtos (Sivinski 1984). Sin embargo en esos leks los machos de laboratorio realizan menos despliegues que los machos de campo en esos leks mixtos. Los machos de laboratorio fueron

observados llamando solos y lejos o fuera de los leks mixtos (estrategia alternativa) y perdieron más encuentros territoriales dentro de un lek que los machos de campo. Las probabilidades de realizar cópulas siguiendo alguna estrategia secundaria como se disertó en la página 38, fueron siempre mucho más bajas que las de machos capaces de defender su territorio en un lek. Por otro lado Spiess (1982) observó que los machos de campo de *Drosophila silvestris* cortejaron menos que los machos de laboratorio, pero fueron más exitosos en los apareamientos. Este investigador llegó a la conclusión que el vigor en el cortejo no parece ser lo más importante en la elección de las hembras, siempre y cuando el macho logre un mínimo de señales, en conformidad con el sistema de reconocimiento de la especie. Así, estos resultados son contradictorios y por lo tanto aún se requiere mayor investigación.

Un factor importante para la TIE se relaciona con la competencia de esperma. Este fenómeno puede ser importante si los machos de laboratorio no producen suficiente cantidad de esperma. Markow et al. (1978) observó que las hembras de *D. melanogaster* prefieren machos vírgenes a machos que se han apareado recientemente. En *C. capitata*, se encontró que la receptividad de las hembras es regulada por el esperma suministrado (Nagakawa et al. 1971). Hendrichs (1986) observó que usualmente las hembras de *A. suspensa* que se aparean con machos pequeños de laboratorio se aparearon otra vez el mismo o al siguiente día. Este autor sugiere que el apareamiento más corto para machos de laboratorio y más largo para machos de campo puede ser el resultado de fuerzas de selección opuestas sobre el tiempo de apareamiento. En el laboratorio la disponibilidad de parejas es más grande; por lo tanto, el cortejo tiende a reducirse y las hembras pierden en cierto grado su poder de elección. En la naturaleza, por otro lado, no siempre se tiene la alta disponibilidad de parejas. Es importante para el éxito de la TIE que los

machos liberados no solo se apareen con las hembras del campo sino también que sean capaces de transferir eficientemente su esperma, si así no lo hiciere la hembra se reapareará hasta que encuentre un macho que complete sus espermatecas.

OBJETIVOS

Dada la necesidad de ampliar la información sobre el comportamiento reproductivo de *C. capitata* para lograr un mejoramiento en el control de la plaga. El presente estudio tuvo como principales objetivos:

- Obtener información básica sobre el comportamiento en el apareamiento a corta distancia (una vez que el encuentro se ha producido) de *C. capitata*. Para ello se observaron los detalles del cortejo mediante macro video análisis tratando de determinar la secuencia de cortejos exitosos.

- Detección de diferencias en los patrones de cortejo entre líneas de laboratorio y moscas salvajes, en condiciones de competencia intra e intersexual, en laboratorio y jaulas de campo.

- Evaluar los posibles efectos de la radiación utilizada para esterilización sobre el comportamiento en el apareamiento, en condiciones de laboratorio y jaulas de campo.

- Contribuir al desarrollo de métodos de control de calidad de las líneas de cría masiva que evalúen la capacidad de competición por el apareamiento con hembras salvajes, tomando en cuenta las posibles diferencias en el comportamiento de poblaciones de diferentes áreas geográficas.

OD

1.1. Obtención de moscas silvestres

El método más eficiente de obtención de muestras de moscas de los frutos consiste en la recolección de frutas con evidencia de ataque de moscas.

La disponibilidad de fruta atacada varía a lo largo del año y entre localidades. Las colecciones se realizaron entre octubre y mayo. Según la época la fruta provino de distintas localidades y distintos hospederos.

Se recolectaron frutas con evidencias de ataque por tefrítidos (orificios de oviposición) en zonas donde no se ejercía control de plagas por medio de insecticidas. Dicho material, que contenía huevos y larvas de *C. capitata* de diferentes estadios se utilizó para obtener moscas adultas salvajes. Para ello se colocaron las frutas sobre un lecho de arena seca. Al finalizar el tercer estadio, las larvas abandonan la fruta saltando a la arena para empupar sobre ella. A 23°C la etapa larval dura aproximadamente 11 días, por lo que se conservó la fruta durante aproximadamente dos semanas. A partir del 3° día después de que comenzaron a saltar las larvas de 3° estadio se tamizó la arena dos veces por semana para separar las pupas. Este procedimiento se repitió hasta que dejaron de aparecer pupas.

Las pupas se colocaron en frascos de vidrio con tapa de espuma de poliuretano, hasta la emergencia de los adultos. A 23°C la etapa adentro del pupario dura unos 13 días. A partir de la emergencia del primer adulto todos los días se separaron los imagos emergidos, y se colocaron los machos y hembras en frascos diferentes con tapa de poliuretano. Dado que se requieren al menos 3 días para alcanzar la madurez sexual,

este método permitió obtener moscas vírgenes de diferentes edades para ambos sexos. Estas fueron mantenidas en números no superiores a 60 en frascos de vidrio de 400 ml o no superiores a 200 en frascos de 2750 ml. Se alimentó a las moscas adultas con una mezcla de sacarosa-levadura (3:1) y el agua se suministró como gel de agar al 1%. Para los frascos chicos se utilizan recipientes de 10 ml, que se renovaron 2 veces por semana; para los frascos grandes se usaron recipientes de 25 ml que se renovaron 1 vez por semana. Las moscas se envejecieron en cámara de cría con temperatura controlada de 23 a 25 °C y fotoperíodo 12:12 hs. luz-oscuridad, hasta la edad necesaria para las pruebas. El ambiente se mantenía con una humedad alta (40-95 %) utilizando un vaporizador regulado por un temporizador.

1.2. Cría de líneas en laboratorio

Con el fin de amplificar el material salvaje colectado para las diferentes pruebas o mantener las líneas de laboratorio, el método de recolección y manejo de huevos, cría de larvas pupas e imagos fue el propuesto por Terán (1977).

Para la oviposición y recolección de huevos se utilizaron frutas artificiales de plástico coloreado de aproximadamente 4 cm de diámetro a las cuales se les realizó múltiples perforaciones con una aguja incandescente y un orificio de 1.5-2.0 cm de diámetro en la parte superior. Por este orificio se colocó un tapón de corcho con un pedazo de espuma de poliuretano mojado para mantener el interior de la fruta saturado de humedad. Este dispositivo se colgó en el interior de un frasco de 2750 ml, conteniendo no más de 200 individuos de ambos sexos, suspendido por un alambre desde la boca del frasco. Las frutas se retiraron cada 24 o 48 hs dado que este período es inferior a tiempo de

desarrollo embrionario. Para la recolección de huevos se quitó el tapón, se arrastraron los huevos con agua destilada por medio de una piseta y se vertieron sobre un papel de filtro colocado en un embudo. Después del filtrado, se agruparon los huevos con una espátula en un área de papel no superior a 1-1.5 cm de diámetro, se recortó la misma y se la colocó sobre medio de cultivo para larvas. El medio utilizado fue el de Terán (1977) con modificaciones introducidas en el Instituto de Genética "Ewald Favret", CNIA, INTA (Quesada Allué et al. 1994). Los tres estadios larvales se desarrollaron en ese medio que debe mantenerse húmedo especialmente durante los primeros días del desarrollo larval. El medio se colocó en cubetas de 25 ml. En cada cubeta se sembraron 50 a 200 huevos. Cada cubeta se colocó en un frasco de 200 ml sobre un lecho de arena. Estos frascos se taparon con poliuretano y colocaron en la cámara de cría en las condiciones antes mencionadas. Las larvas del tercer estadio abandonaron el medio de cultivo saltando a la arena para empupar.

2. Métodos experimentales

2.1. Experimentos en jaulas de campo

2.1.1. Jaulas:

La jaula para moscas, confeccionada con una malla plástica, es cilíndrica con piso y techo. Sus medidas son 2.9m de diámetro y 2.0m de alto. El acceso a la jaula se realiza a través de un cierre vertical a cremallera en la pared. El piso posee dos cierres que permiten alojar una planta hospedera dentro de la jaula y cerrar la abertura alrededor de

la base del tronco. La red se mantiene erguida por medio de una estructura tubular construida por fuera con caños de PVC de 4.0 cm de diámetro (Fig.1 a).

Las jaulas de campo se armaron a la intemperie en el Campo Experimental de Ciudad Universitaria, rodeando un árbol cítrico joven (Fig.1 b).

2.1.2. Marcado de moscas:

Para identificar los machos de diferentes grupos que se ingresaron en la misma jaula, se los marcó con pinturas al agua de diferentes colores sobre el protórax. Para ello se colocó a los machos en una bolsita de tul y, reteniéndola suavemente con los dedos sobre una mesa se los pintó con un pincel fino a través de la malla de la tela. Dicho procedimiento se realiza dos días antes de las pruebas para permitir que los individuos se recuperen y descartar a aquellos que pudieran haber sido afectados por la manipulación.

2.1.3. Desarrollo del experimento:

Cada día a la mañana, entre las 7 y las 9 hs. según el experimento, se liberaron los machos vírgenes en la jaula. Luego de la liberación se permitió a los machos que estableciesen su territorio y se integrasen a leks durante una hora. Luego de transcurrido ese tiempo se liberaron las hembras vírgenes. A partir de ese momento se ingresó a la jaula durante intervalos regulares de tiempo durante el día para extraer las parejas en cópula y registrar las observaciones requeridas en cada experimento. Al final de cada día de prueba se limpió la jaula de moscas retirando los individuos no apareados.

a

b

Figura 1. a) Jaulas de campo. b) Arbol cítrico joven adentro de la jaula

2.2. Experimentos de videograbación

Se utilizó un equipo de videograbación (Fig.2a) armado en un cuarto con temperatura controlada (23°C aproximadamente) y acústicamente aislado para el correcto registro de las señales sonoras.

El equipo adecuado para permitir la grabación en laboratorio constó de una videocámara Hi8 modelo CCD-TR805 (Sony, Japón) con un lente para primer plano (Novoflex, Alemania), un televisor color modelo 14GX1510/77B (Phillips, Argentina), una videograbadora modelo H-J401EN (JVC, Japón), un micrófono modelo K6P/MKE102 (Sennheiser, Alemania) y una luz puntiforme.

Las moscas fueron colocadas en cinco cajas de apareamiento (Fig. 2b). Estas consisten en cámaras cilíndicas de acrílico trasparente, de 150mm de diámetro x 100mm de alto, cerradas en la parte superior por una cápsula de petri. La base se colocó sobre un disco de vidrio transparente de 2mm de espesor. Este disco estaba sostenido por una base giratoria. Las grabaciones fueron hechas a través de este vidrio desde abajo. El micrófono se colocó a través de un agujero lateral en la caja. Otro agujero lateral se utilizó para liberar las moscas dentro de la caja. Para ello se utilizaron tubos de liberación de insectos, estos se fabricaron cortando la parte anterior de una jeringa descartable. Se permitía a la mosca entrar suavemente a la jeringa por el extremo cortado y luego con el émbolo de la misma se la guiaba para entrar en la caja de apareamiento. Este método permitió lograr una menor perturbación de los individuos que si se utilizaba un aspirador.

Todos los insectos utilizados para las observaciones debían tener la edad en la que se alcanza la máxima actividad de cortejo.

Las video grabaciones fueron realizadas durante el período de mayor apareamiento estimado en el experimento en jaulas de campo (10:00 a 14:00 hs)

Cada mañana se acondicionaban las cajas de apareamiento colocándoles una hoja de cítrico fresca en la cara superior interna para simular las condiciones naturales (Fig.2b), pues en el campo los machos establecen su territorio en la cara abaxial de las hojas de los árboles frutales.

Aproximadamente 30-60 minutos antes de que comience el período de máxima actividad de apareamiento se colocó un macho en cada caja de apareamiento (5 en total) utilizando un tubo de liberación.

Para la videograbación del cortejo se aplicó el siguiente procedimiento:

- Se esperó que los machos se apacigüen y establezcan su territorio.
- El primer macho que comenzaba a llamar, en forma continua durante 5 minutos, era elegido para la primera grabación.
- Girando el disco de vidrio se colocó la caja seleccionada arriba de la videocámara.
- Se empezó a grabar acercando el "zoom" al máximo sobre el macho llamando para permitir reconocer detalles y corroborar la llamada del macho en análisis subsiguientes.
- Pasados 5 minutos se colocó la lente en posición "wide" (vista panorámica de la cámara de observación).
- Se liberó suavemente la hembra dentro de la caja de apareamiento, anotando la hora de liberación.
- Se registraron los detalles de comportamiento de ambos, macho y hembra pero dando prioridad al macho cuando fuera imposible grabar a ambos.

- Cada vez que la distancia entre hembra y macho fue menor de 3cm, se realizó un acercameineto mediante el "zoom", para captar los detalles del comportamiento de ambos (manteniéndolos dentro del encuadre con la máxima ampliación posible).
- Cuando se observó un intento de apareamiento se tomó nota, consignando la hora para cada intento y si fue exitoso o no. Si se producía la cópula el observador se acercaba al mi al micrófono y decía "cópula" para luego poder evidenciar el momento exacto.
- Se grabó durante 30 minutos desde la liberación de la hembra, independientemente de las actividades desplegadas por el macho. Este fue considerado exitoso si copulaba dentro de ese período.
- Finalizada una grabación se giraba el disco sobre la cámara al siguiente macho que estuviera llamando.

Luego de realizadas las grabaciones las mismas fueron analizadas, clasificando los diferentes componentes del cortejo y el tiempo empleado en cada uno de ellos a lo largo de los 30 minutos registrados. Cuando fue necesario se utilizó la función cuadro por cuadro de la videograbadora, la cual provee una resolución de 1/30 de segundo.

a

b

Figura 2. a) Equipo de videograbación. b) Caja de apareamiento

Determinación de las condiciones óptimas de apareamiento en jaulas de campo

1.1 INTRODUCCION

La división del tiempo entre actividades reproductivas y alimentarias representa un problema evolutivo para el cual cada especie de insectos encontró una solución particular. Esta solución refleja los mandatos ecológicos del ambiente de los insectos y coacciones específicas fisiológicas y comportamentales (Roitberg 1985; Stearns 1989; Bell 1990). Algunas especies, especialmente de lepidópteros, resuelven este problema en una escala de tiempo estacional, concentrando alimentación y crecimiento en un período de desarrollo y reproducción en otro. Por otro lado, el éxito reproductivo de otras numerosas especies gira sobre sus habilidades, como adultos, para forrajear eficientemente para obtener recursos nutricionales. Estos recursos deberán ser cuidadosamente aprovechados como una manera de satisfacer las necesidades somáticas y reproductivas del individuo (Rauberhaimer y Simpson 1995). Además, estos adultos deben decidir cuándo forrajear para obtener recursos nutricionales, y cuándo invertir tiempo en reproducción (búsqueda de pareja, cópula, oviposición) (Bell 1990). Estas decisiones son frecuentemente disparadas por umbrales fisiológicos, que dictan y regulan la expresión de comportamientos específicos.

Se han observado repetidamente patrones discretos de comportamiento circadiano en *C. capitata* en poblaciones de laboratorio (Causse y Féron 1967; Smith 1989), seminaturales (Prokopy y Hendrichs 1979; Prokopy et al. 1996) y ambientes naturales (Cayol 1996; Hendrichs y Hendrichs 1990; Hendrichs et al. 1991; Whittier el al. 1992;

Warburg y Yuval 1997. Los patrones de actividades observados indican una partición del día entre actividades nutricionales y reproductivas. En general las actividades del macho son reguladas y discretas, con una separación entre actividades de forrajeo y reproductivas, mientras que las hembras están ocupadas en diferentes actividades a través del día. Los machos se congregan en leks desde la mitad de la mañana hasta la tarde temprano y raramente en este período se ocupan de otras actividades. La alimentación de ambos sexos tiene lugar al anochecer, suplementariamente también a la mañana y las hembras ocasionalmente comen durante todo el día (Hendrichs y Hendrichs 1990; Hendrichs et al. 1991; Warburg y Yuval 1997). La oviposición tiene lugar esporádicamente a toda hora, pero se concentra primariamente en la segunda mitad del día.

El modelo de jaula de campo utilizado en este experimento ya fue empleado y estandarizado para evaluar la propensión al apareamiento y competencia entre diferentes líneas de *C. capitata* y otras moscas de la fruta, bajo condiciones de campo (Chambers et al. 1983). Estas jaulas son el mejor compromiso entre condiciones de laboratorio y costosas e impracticables observaciones de campo para evaluar el comportamiento en el apareamiento de las moscas de la fruta bajo condiciones seminaturales. Por esta razón en el presente proyecto se propone la utilización de estas jaulas para obtener estimaciones extrapolables a condiciones naturales.

El presente trabajo fue realizado con la intención de caracterizar en jaulas de campo las condiciones que favorecen el éxito en el apareamiento en *C. capitata*, incluyendo factores ambientales y de desarrollo para moscas salvajes. La información producida por este experimento fue utilizada para tratar de simular las condiciones óptimas en los experimentos de videograbación en el laboratorio.

1.2 MATERIAL Y METODOS

1.2.1 Obtención de moscas silvestres

De fines de febrero a principios de marzo de 1995 se recolectaron duraznos atacados de un monte frutal del INTA de San Pedro, Pcia. de Buenos Aires (33° 46'latitud S, 59° 44'longitud O). Dicho material, que contenía huevos y larvas de *C. capitata* de diferentes estadios, fue utilizado para obtener moscas adultas salvajes en Instituto de Genética "Ewald Favret", CNIA, INTA Castelar y se trasladaron los adultos separados por sexo y por edad hasta la Ciudad Universitaria donde se envejecieron hasta la edad necesaria.

1.2.2 Desarrollo del experimento

Se realizó una prueba piloto en jaulas de campo para caracterizar las condiciones óptimas (climáticas y biológicas) para el apareamiento. El experimento se realizó entre el 24 de marzo y el 2 de abril. Se comenzó con 3 grupos de machos y 3 grupos de hembras de diferentes edades (3, 5 y 7 días respectivamente). Cada grupo estaba constituido por 15 individuos.

Como las clases mas jóvenes (3 y 5 días) fracasaron en el apareamiento en los primeros 2 días (2 ensayos), en los siguientes días se incrementó la edad de los grupos. De acuerdo con la posibilidad de obtener individuos de diferentes edades durante el período que duró el experimento las edades utilizadas fueron las siguientes:

-5, 7 y 9 días (15 individuos de cada edad): 2 ensayos

-7, 9 y 11 días (15 individuos de cada edad): 2 ensayos

-9, 11 y 13 días (15 individuos de cada edad): 1 ensayo

-7, 9, 11 y 13 días (10 individuos de cada edad): 1 ensayo

-11, 13, 15 y 17 días (10 individuos de cada edad): 1 ensayo.

La noche previa a cada día de observación se liberaron en la jaula los 3 (o 4) grupos de machos, con marcas de diferentes colores para identificar su edad. Las hembras, también marcadas, fueron liberadas a las 7 de la mañana. Cada hora se ingresó en la jaula, entre 7:30 y 17:30 horas, para extraer las parejas formadas registrándose el número de parejas en cópula y la edad de las moscas apareadas. Además, se registraron a cada hora variables climáticas y físicas: temperatura, humedad, presión atmosférica, intensidad luminosa y lluvia caída. Los datos de las variables climáticas fueron provistos por el Departamento de Meteorología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, cuya estación experimental automática está localizada en el mismo campus a unos 200m de la jaula de campo.

1.2.3 Métodos estadísticos

1.2.3.1 Efecto de la edad

La relación entre la edad y la proporción de apareamiento fue analizada por medio de una prueba de Chi cuadrado, comparando la proporción de individuos apareados de cada edad con la proporción esperada, asumiendo como hipótesis nula que todas las edades tuvieran la misma probabilidad de aparearse. El número esperado de apareamientos para cada clase de edad fue estimado como:

$$e = i.p.N$$

donde i representa la proporción de individuos de cada clase de edad, p es la proporción de individuos apareados para el total de la muestra y N es el tamaño de la muestra.

I.2.3.2 Efecto de las variables físicas y climáticas

El posible efecto de luminosidad, temperatura, presión, humedad y lluvias sobre la tasa de apareamiento fue analizado con una regresión múltiple de a pasos o "stepwise".

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Efecto de la edad

Al analizar la relación entre la edad y la proporción de apareamiento comparando la proporción de individuos observados de cada clase de edad con la proporción esperada se encontró que la tasa de apareamiento es mayor para las moscas de mayor edad, siendo el número de apareamientos observado mayor que el esperado para moscas de 11 o mas días de edad (Tabla I-1).

1.3.2 Efecto de variables físicas y climáticas

La máxima tasa de apareamiento fue registrada entre las 10:00 y las 14:00 horas, en coincidencia con las horas de mayor luminosidad (Fig. I-1). El efecto de las restantes variables físicas/climáticas (temperatura, humedad, presión, lluvia) sobre la tasa de

apareamiento no es significativo de acuerdo con un análisis de regresión múltiple "Stepwise" ($p > 0.05$).

La temperatura media ambiental durante el curso del experimento fue de 23°C, con un intervalo de 15°C a 28.6°C. La humedad relativa ambiente media fue de 58% con un intervalo de 40% a 92%.

Tabla I-1. Porcentajes de apareamientos observados y esperados para cada clase de edad.

	Machos		**Hembras**	
Edad	**Observados**	**Esperados**	**Observados**	**Esperados**
3	1.92	7.69	0.00	7.69
5	1.92	15.38	1.92	15.38
7	17.31	23.08	13.46	23.08
9	17.31	19.23	13.46	19.23
11	19.23	15.38	21.15	15.38
13	21.15	11.54	28.85	11.54
15	11.54	3.85	5.77	3.85
17	9.62	3.85	15.38	3.85
χ^2	26.39		46.23	
P	0.0004		<0.0001	

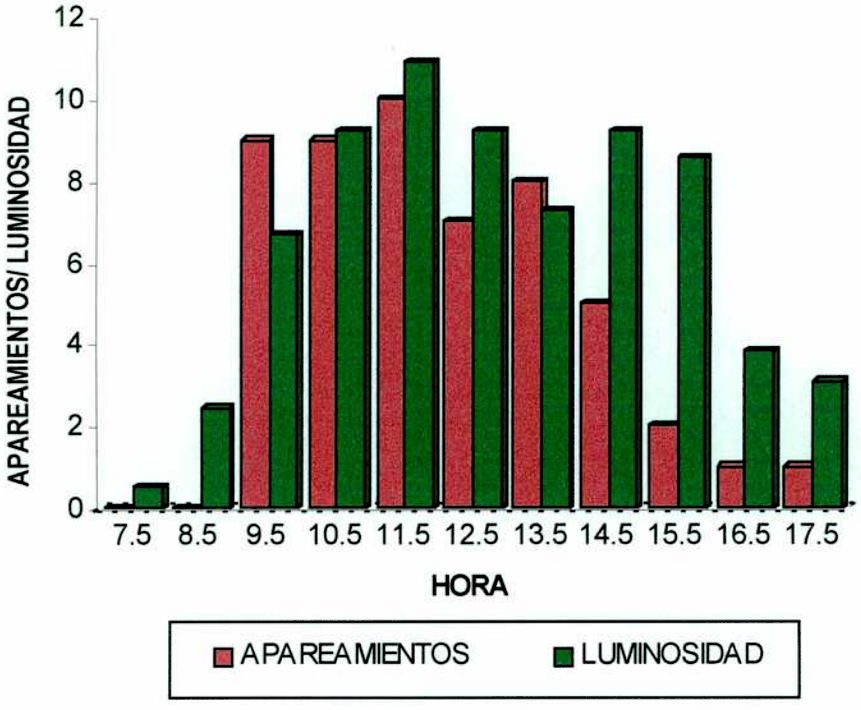


Figura I-1: Número de parejas apareadas y luminosidad media registrada como una función de la hora a través de el experimento en jaulas de campo. La luminosidad fue expresada en valores arbitrarios, registrados por un fotómetro fotográfico.

1.3.3 Distribución de parejas en la jaula

Casi todas las parejas censadas se encontraron sobre el árbol, excepto dos que se encontraron en la red. Se pudo observar que los machos establecían su territorio en la cara abaxial de las hojas del pequeño árbol cítrico y también en los frutos, agregándose en zonas específicas del interior de la copa del árbol formando "leks" (Fig.I-2). Cada macho establece su territorio de apareamiento en una hoja, por medio de feromonas producidas en la parte posterior del abdomen en forma de gota. Desde allí los machos atraen a las hembras al área de lek. Los leks estaban constituidos por grupos de 3 a 5 machos.

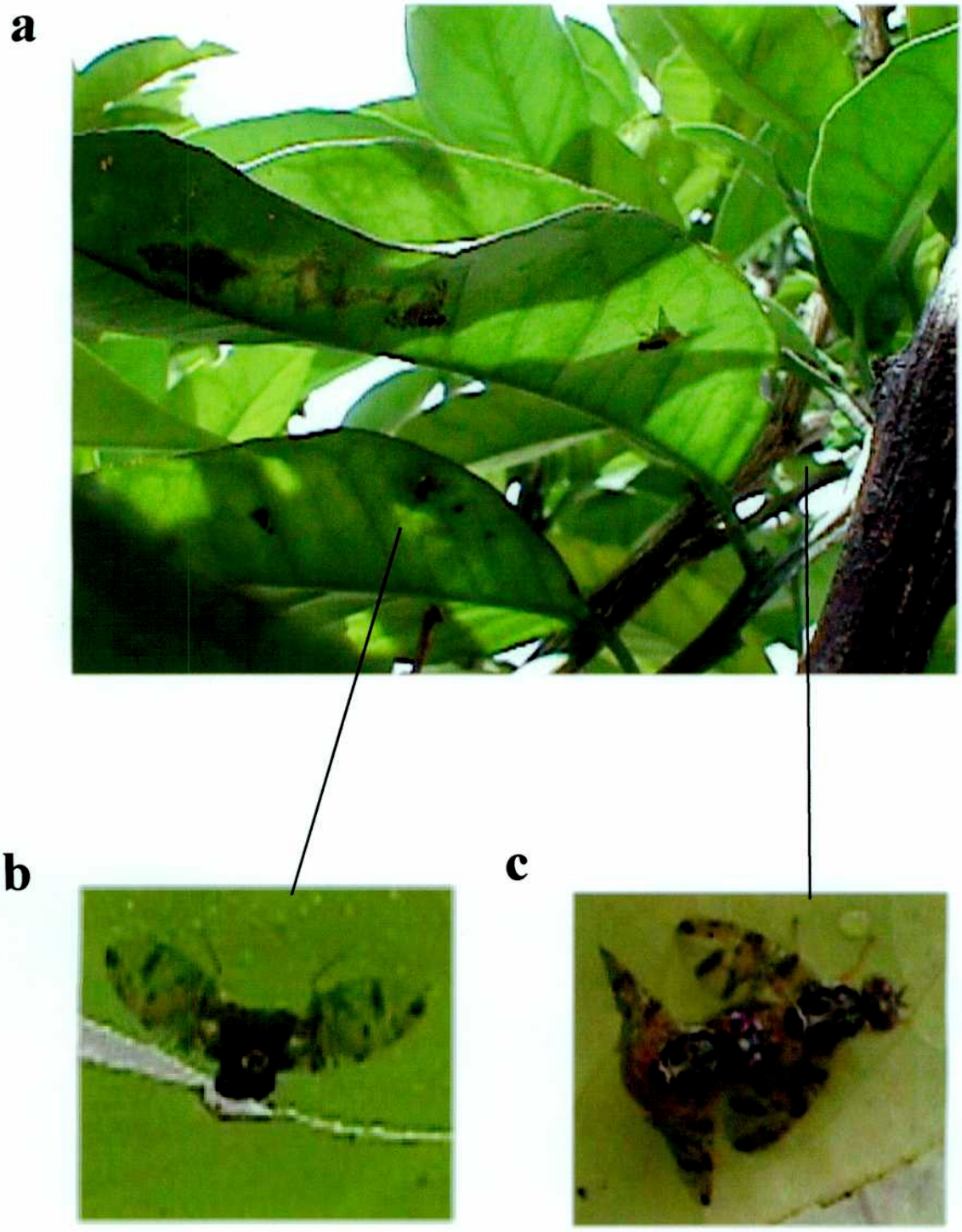


Figura I-2. a) Area de lek en el árbol. b) Macho "llamando" en el lek. c) Pareja copulando en el árbol.

1.4 DISCUSION

1.4.1 Factores ambientales

En tefrítidos, la iniciación de la actividad sexual diaria en la naturaleza es regulada por cambios en las condiciones ambientales, luz y/o temperatura (Cayol 2000). En algunas especies como *A. frateculus* el factor más importante que regula la iniciación de la actividad sexual es la intensidad de la luz (Malavasi et al. 1983). En otras especies como la mosca del Mediterráneo el factor limitante más importante es la temperatura, de modo que la actividad sexual de estas especies están confinadas a las horas más cálidas del día (Hendrichs y Hendrichs 1990).

Por tal motivo los resultados obtenidos en este experimento sobre el período del día de mayor apareamiento son aplicables sólo al lugar donde fueron realizadas y pueden no ser extrapolables a otras poblaciones en otros lugares del planeta donde tanto las condiciones climáticas como interacción con otras especies relacionadas sean diferentes. Sin embargo, los resultados de este estudios coinciden con los obtenidos por Cayol et al. (1999) en pruebas en jaulas de campo realizadas en la provincia de Tucumán, Argentina.

El fotoperíodo como un regulador del ritmo circadiano fue estudiado por Tychsen (1978). Smith (1979) examinó el mecanismo genético que controla la regulación del tiempo de apareamiento y la respuesta a la intensidad de luz. Este autor encontró que el comportamiento sexual está influenciado por la interacción entre la intensidad de luz y el ritmo circadiano.

La fototaxis positiva puede tener influencia en la formación de los leks. Para *A. schiner* (Flitters 1964) y *Dacus dorsalis* (Roan et al. 1954) se ha demostrado la influencia de la

intensidad de luz sobre la fecundidad y la tasa de apareamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos para *C. capitata* en este capítulo donde la máxima tasa de apareamiento coincide con la máxima intensidad de luz.

Myburg (1962) vio, bajo condiciones externas, que las cópulas se iniciaron sólo a altas intensidades de luz, arriba de 2000 lux, a temperaturas entre 19 y 31°C y humedad relativa entre 30-95%.

El mayor factor ambiental que regula el comportamiento es aparentemente la temperatura. Algunos autores observaron que las temperaturas elevadas inhiben el vuelo y las actividades sexuales (Baker y Van der Valt 1992; Hendrichs y Hendrichs 1990, Prokopy et al. 1987). En Egipto, donde prevalecen las temperaturas altas, Hendrichs y Hendrichs (1990) encontraron muy baja actividad durante el mediodía, resultando en un patrón bimodal de llamado para el macho y de oviposición y alimentación para la hembra. Similarmente, ese patrón de actividades bimodal se vio también en Túnez, donde las temperaturas medias exceden los 30°C (Cayol 1996). Además, se observó que un aumento elevado de temperatura conduce a las moscas al centro de la copa de los árboles donde está más fresco (Hendrichs y Hendrichs 1990; Baker y Van der Valk 1992). En Chios, Hawai, México e Israel las temperaturas en la época que se realizaron las observaciones no fueron tan altas, no imponiendo restricciones en el comportamiento, resultando en un patrón circadiano de actividades similar y unimodal (Yuval y Hendrichs 2000).

En el presente trabajo la tasa de apareamiento no pareció estar influenciada por la temperatura, dentro del intervalo de temperaturas registradas durante el ensayo. Esto se pudo deber a que el ensayo se realizó durante un período del año donde las temperaturas

fueron benignas y la amplitud térmica diaria no fue muy marcada. Debido a esto también se observó que el patrón de distribución de las cópulas fue unimodal.

El ritmo de apareamiento de dos especies del género *Ceratitis* fue estudiado para establecer su relación con el aislamiento reproductivo entre las mismas. En la isla de La Reunion se vio en jaulas de campo que moscas de *C. rosa* Karsch salvajes se aparean sólo por la tarde (el máximo se da entre 18:30 y 19:00 hs.), mientras que *C. capitata* en simpatría, se aparea preferentemente en la mañana temprano. El máximo se observa entre 7:00 y 9:00 hs, con un pico más pequeño entre 13:00 y 14:00 hs y unos pocos apareamientos aislados de *C. capitata* se dan a través del día (Quilici y Franck 1997).

C. capitata se ha diseminado alrededor de el mundo y aparenta tener un patrón geográfico de actividades de apareamiento. En Guatemala, el máximo de actividad de llamado (calling) fue registrado entre las 11:00 y 14:00 hs. En Hawai hubo dos picos, uno pequeño a las 10:00 hs y uno más grande entre el mediodía y las 14 hs (Whittier et al. 1992). Este patrón de llamado parece ser el inverso de el observado en La Reunion. En Egipto el patrón bimodal se parece al encontrado en la isla de La Reunión, un pico principal a la mañana (antes de la parte más cálida del día) y uno más pequeño a la tarde. En Chios (Grecia) e Israel los máximos de apareamientos ocurren durante el mediodía (Sivinski et al. 2000). De acuerdo con estos estudios, aparentemente en lugares donde las interacciones con especies cercanas no son posibles (Grecia, Israel, Guatemala y Hawai) las actividades de apareamiento ocurren en un período del día similar al de *C. rosa* (horas de la tarde) (Sivinski et al. 2000).

El llamado a la tarde por *C. capitata* en regiones en alopatría puede representar un cambio temporal dentro de un bloque de tiempo ocupado por el llamado de *C. rosa* en áreas en simpatría. Si así es, esto apoya la hipótesis de que la variación en el ritmo de

apareamiento evolucionó como un mecanismo para reducir la tasa de hibridación (Sivinski et al. 2000).

1.4.2 Efecto de la edad

En los resultados se vio que las moscas de menor edad, 3 y 5 días, utilizadas en la experiencia prácticamente no se apareaban. Esto es consistente con estudios que indican que las moscas jóvenes de *C. capitata* no participan en actividades reproductivas (Bateman 1972; Christenson y Foote 1960; Féron 1962).

El comienzo del comportamiento sexual en machos y la receptividad sexual en las hembras está relacionado con la edad. Por lo tanto las moscas jóvenes emplean su tiempo en actividades de alimentación, entrando en la población sexual cuando ellas tienen entre 7 y 10 días de edad (Yuval y Hendrichs 2000).

Los resultados del análisis del efecto de la edad sobre la tasa de apareamiento en el presente experimento son aplicables para moscas salvajes y no son totalmente extrapolables a mosca de cría masiva, porque se ha observado que en estas últimas la madurez sexual se alcanza mucho antes que en las salvajes. Esto fue demostrado en *C. capitata* (Rössler 1975; Dridi 1990). Esta diferencia es una consecuencia de las condiciones no naturales de cría, producidas por una rápida e intensa selección a favor de un acortamiento del ciclo de vida (Bush et al. 1976; Leppla et al. 1983). Además, la dieta de las larvas tiene un alto nivel nutritivo y los adultos emergen con altas reservas energéticas y consecuentemente son sexualmente maduros más temprano que los insectos salvajes. Esto fue demostrado para la mosca del Mediterráneo (Rössler 1975; Dridi 1990) y otros tefrítidos.

Análisis del cortejo del macho de C. capitata por el método de videograbación y detección de diferencias entre una línea de cría masiva y moscas salvajes

2.1 INTRODUCCION

A pesar del reciente incremento drástico en información sobre el comportamiento sexual de la mosca del Mediterráneo, se conoce poco sobre qué determina el éxito o fracaso de un dado cortejo. Las investigaciones sobre este aspecto son de gran importancia si se toma en cuenta que últimamente se están invirtiendo grandes sumas de dinero para el control de las poblaciones de *C. capitata* con machos estériles, método que depende enteramente de el éxito o fracaso de los cortejos de dichos machos en la naturaleza. Estudios recientes indican que una importante limitación de los intentos de combatir las poblaciones silvestres con machos de cría masiva esterilizados es la eficiencia relativamente baja de su comportamiento en el cortejo.

Féron (1962) fue el primero en describir algunas de las etapas de la secuencia del patrón de cortejo. Un macho sexualmente activo se posa en la cara abaxial de una hoja, permanece inmóvil en el proceso de producción de feromona, con la pleura abdominal expandida, y la gota de feromona en la parte posterior del abdomen dorsalmente rodeada de epitelio rectal (Arita y Kaneshiro 1986). Así presumiblemente libera feromonas que atraen a la hembra (estadio I de Féron). Cuando la hembra se aproxima al macho éste la enfrenta y comienza a realizar un abanicado continuo de las alas (estadio II de Feron). Luego el macho despliega un segundo tipo de movimiento con sus

alas en el cual éstas se mueven rítmicamente de adelante hacia atrás. Movimientos rápidos de la cabeza acompañan a este aleteo y ambos constituyen el estadio III de Féron. Después de esto el macho intenta copular. Normalmente el apareamiento tiene lugar en la superficie inferior de la hoja que es el territorio del macho (Prokopy y Hendrichs 1979; Aluja et al. 1983; Burk 1983; Morgante et al. 1983; Kuba et al. 1984). La selección de un apareamiento en la naturaleza es hecha por la hembra en base a las señales químicas físicas y visuales del macho (Eberhard 2000).

La competitividad de los insectos criados y esterilizados en forma masiva es quizá el factor más importante para el éxito de un programa de TIE. Los posibles efectos dañinos de la radiación ionizante usada para esterilizar fueron reconocidos desde los primeros días de la TIE (Knipling 1979). Desde entonces se comunicaron muchos experimentos, en los cuales se comparan moscas estériles de laboratorio con moscas de laboratorio no irradiadas o moscas de campo (Hooper y Horton 1981; Rosler 1975; Wong et al 1983; Iwahashi et al. 1983). De todas esas evaluaciones se ha visto que los efectos de la cría masiva continua sobre la competitividad sexual suelen ser más importantes que los de la irradiación. Estos efectos probablemente son el resultado de una selección involuntaria durante el proceso de producción (Cayol 2000).

La tarea dificultosa del manejo de la cría masiva es el balance de los beneficios de una intensa producción de insectos con las cualidades comportamentales del producto final. El proceso por el cual una población de insectos transferida del ambiente natural al laboratorio se denomina frecuentemente como "adaptativo". Sin embargo de acuerdo con la definición Darwiniana, la adaptación es un producto de cambios genéticos que puede ocurrir o no bajo estas condiciones. Ochieng-Odero (1994) definió el término "colonización" de laboratorio de las especies de insectos integrado por tres procesos:

aclimatación, selección y domesticación. Durante una nueva colonización de una población de tefrítidos en el laboratorio sus cualidades comportamentales y estrategias de historia de vida son dislocados en una nueva dirección por estos procesos.

Durante la colonización de laboratorio la presión de selección se centra predominantemente en el estado adulto e induce a una vida adulta corta y una alta especificidad para desempeñarse sólo en las condiciones ambientales constantes de laboratorio.

Como Calkins (1984) señala, hay bastante diferencia entre el apareamiento en condiciones de cría masiva y el ambiente natural de las moscas silvestres. En el campo hay relativamente gran número de machos llamando y solamente pocas hembras vírgenes receptivas. Las hembras tienen la capacidad de ser muy selectivas cuando escogen pareja. Como resultado el cortejo es más complejo que en el laboratorio. Por otro lado, el sistema de cría puede seleccionar un cortejo más simple, exitoso bajo condiciones de aglomeración. Por ejemplo, un cortejo largo en las condiciones de cría masiva tiene el riesgo de ser interrumpido por otros machos. Además la relación de sexos en el laboratorio es 1:1, todas las hembras alcanzan la madurez sexual al mismo tiempo y hay una intensa competencia entre hembras por machos idóneos. Esta situación raramente sucede en el campo. De acuerdo con Harris et al. (1986) el rechazo de la hembra silvestre por un apareamiento rápido en su programa de selección con *C. capitata*, sugiere que la cepa de laboratorio está ya cerca de su potencial máximo, habiendo sido probablemente seleccionado involuntariamente por apareamiento rápido durante la cría rutinaria de laboratorio.

Una técnica básica para llevar a cabo la investigación sobre el comportamiento del cortejo en el apareamiento de la mosca de la fruta es el análisis por medio de

videograbación. Este permite caracterizar con gran detalle las etapas del cortejo y los factores de los que depende el éxito del mismo, y puede poner de manifiesto si existen diferencias presumiblemente heredables entre el comportamiento de cortejo de las diferentes líneas de laboratorio y la mosca del campo (Prokopy and Hendrichs, 1979; Whittier, et al., 1994).

El presente trabajo fue realizado con la intención de incrementar los conocimientos de la selección sexual en *C. capitata* poniendo especial énfasis en el comportamiento durante el cortejo.

En condiciones normales hay una gran dificultad para diferenciar entre la competencia intrasexual e intersexual y se plantea que la elección por parte de la hembra sería solo una consecuencia de la selección intrasexual. A través de los diseños experimentales que se aplicaron en el presente proyecto fue posible discriminar entre estos dos componentes, puesto que al aislar a los machos se evitó la influencia de la competencia entre ellos, es decir que se pudo eliminar experimentalmente la competencia intrasexual.

En condiciones óptimas simuladas en laboratorio (T°, hora, luz) se analizaron en cajas pequeñas, por la técnica de videograbación, cortejos exitosos y no exitosos. En estos ensayos se eliminó todo efecto de agregación e interacción entre machos. Las moscas utilizadas provinieron de una población salvaje y una línea de cría masiva. Se determinaron y cuantificaron las diferencias en el comportamiento en el cortejo entre los machos de ambas líneas y se identificaron los componentes principales del comportamiento del cortejo asociados con apareamientos exitosos.

2.2 MATERIAL Y METODOS

El material utilizado fue coleccionado a fines de marzo de 1995 en Alto Valle, Provincia de Río Negro, por investigadores y técnicos del Subprograma PROCEM Patagonia. Los duraznos atacados fueron enviados a IG/CICA/INTA Castelar.

Ante la necesidad de obtener suficiente número de individuos de la línea salvaje y de la edad elegida a lo largo de todo el experimento fue necesario criar las moscas salvajes hasta la G2. Estas moscas se denominarán de aquí en adelante Patagonia.

La segunda línea utilizada, denominada Mendoza, proveniente del insectario de esta provincia (ISCAMEN), donde se criaba en forma masiva para el control de plagas. Esta línea tiene fenotipo salvaje y se utilizó para control de la plaga mediante la TIE hasta 1996, cuando fue reemplazada por la línea de sexado genético con pupa blanca Seib-6-96. La línea Mendoza se originó de moscas salvajes coleccionadas en esta provincia y tiene más de 100 generaciones de laboratorio. Ambas líneas, Mendoza y Patagonia, fueron cedidas por IG/CNIA/INTA Castelar, en estadio de larva o pupa.

Para el experimento de video grabación se utilizaron machos de ambas líneas, enfrentados siempre con hembras salvajes (Patagonia).

Las pupas se mantuvieron hasta la emergencia de los adultos. Los adultos se envejecieron hasta 11 días (edad óptima para el apareamiento determinada en la prueba anterior en jaulas de campo) en frascos individuales para evitar la interacción con individuos, aún del mismo sexo. Las pupas y los adultos se mantuvieron en cámara de cría en las condiciones descriptas en la página 46.

El experimento se realizó entre el 30 de junio y el 29 de agosto de 1995. En cada grabación se enfrentó un macho con una hembra salvaje. El número total de grabaciones fue de 76, de ellas 39 correspondieron a machos de Mendoza y 37 a machos de Patagonia.

Cada mañana se colocó un macho en cada caja de apareamiento. Cada día se utilizaron machos de la misma línea. Intercalando el tipo de macho día a día.

Se grabó durante 30 min, desde la liberación de la hembra. Cada día se realizaron dos grabaciones.

Análisis estadísticos

Las diferencias en el tiempo (en segundos) empleado en cada actividad se evaluaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, utilizando el programa Statistica (Statsoft 1996). Las comparaciones se hicieron entre líneas y entre machos exitosos y no exitosos de cada línea.

2.3 RESULTADOS

Los términos utilizados para describir las actividades observadas durante el cortejo del macho fueron convenidos por los diferentes grupos internacionales que participaron en el "FAO/IAEA Research Co-ordination Meeting on Medfly Mating Behaviour Studies" (Viena 1994) para estandarizar el análisis de comportamiento en el apareamiento de la mosca del Mediterráneo. Las diferentes actividades del cortejo pueden definirse como sigue:

S: "Stationary" = El macho no intenta atraer a la hembra y permanece quieto o limpiándose.

M: "Mobile" = Similar al anterior pero el macho se desplaza caminando o volando.

CS: " Stationary calling " = El macho permanece quieto llamando con la pleura abdominal expandida. Forma una gota de feromona en la parte posterior del abdomen rodeada por epitelio rectal, y mantiene el abdomen contraído de forma tal que la gota queda hacia el lado dorsal (corresponde a la etapa I de Féron 1962).(Fig. II-1,a)

CM: "Mobile calling " = Similar al anterior, pero se desplaza marcando el territorio. Algunas veces el macho baja el extremo del abdomen con la gota, tocando la hoja con ella.

Fa: "Fanning" = El macho realiza un aleteo continuo al detectar la presencia de la hembra, y la ventilación de las alas envía la feromona hacia la hembra (etapa II de Féron 1962).(Fig. II-1, byc). Durante esta actividad el macho revierte su abdomen hacia abajo, de modo que la gota de feromona y la pleura abdominal quedan ubicados hacia la hoja. La pleura abdominal pulsa frecuentemente durante esta etapa. El aleteo produce un sonido que probablemente sea un estímulo auditivo hacia la hembra.

B: "Buzzing" = zumbido intermitente que produce por medio de un aleteo intenso y también intermitente, cuando la hembra se le acerca y quedan frente a frente(Fig. II-2,a). Se puede observar como los bordes de las alas de la hembra se levantan por el

aleteo del macho. Por medio de las imágenes de video se pudo ver que el macho retrae hacia el interior de su cuerpo total o parcialmente la gota de feromona. Sin embargo la pleura abdominal continua expandida. Durante esta etapa se distinguen intensos sonidos intermitentes que como en el caso anterior significarían una señal acústica hacia la hembra.

"Head rocking" = movimientos rápidos de rotación de la cabeza hacia un lado y hacia otro que acompañan al "buzzing" (etapa III de Feron 1962)

VA: "Violent attempt" = Intento violento de apareamiento, el macho salta sobre la hembra y ésta lo rechaza violentamente, en muy pocos casos el macho consigue copular.

PA: "Peaceful attempt" = Intento pacífico de apareamiento, el macho salta sobre la hembra y se reorienta colocándose paralelamente a ella, la mayoría termina en cópula y sólo en algunos pocos casos la hembra rechaza pacíficamente al macho (Fig. II-2, byc).

C: "Copulation" = Cópula (Etapa IV de Feron 1962). Luego de saltar y reorientarse sobre la hembra, el macho es aceptado por la hembra e introduce su aedeagus dentro de la genitalia de la hembra (Fig.II-3). En algunos casos se observó que el macho frota el abdomen de la hembra con sus patas traseras para lograr la intromisión. Durante la cópula el macho puede realizar algunos movimientos "empujando" de diferente ritmo e magnitud y también en algunos momentos de la cópula el macho frota con sus patas traseras y medias sobre la superficie ventral del abdomen de la hembra.

Fi: "Fight" = Interacción agresiva iniciada por el macho, la hembra o ambos.

MJ: "Missed jump" = salto errado, el macho salta tratando de comenzar la cópula pero fracasa en aterrizar sobre la hembra.

De acuerdo con las observaciones, todos los cortejos exitosos constan de la siguientes secuencia de comportamientos en machos:

"CALLING"→ "FANNING"→ "BUZZING"→ "PEACEFUL ATTEMPT"→ "COPULATION" (Fig.II-1a3)

En el estudio realizado se pudieron reconocer las actividades mencionadas y caracterizar el patrón de cortejo de las 76 parejas videograbadas.

Las frecuencias absolutas de machos exitosos y no exitosos se muestran en la TablaII-1.

Tabla II-1. Frecuencia absoluta de machos de *C. capitata* exitosos y no exitosos en el apareamiento, en videograbaciones de machos salvajes y de laboratorio con hembras salvajes.

	Exitosos	**No exitosos**
Mendoza	19	20
Patagonia	14	23

χ^2= 0.91, GL= 1, p= 0.34

Si bien la proporción de machos exitosos no difiere entre líneas ($p > 0.05$), se observaron algunas diferencias en el comportamiento en el apareamiento del macho cuando se comparó el tiempo empleado para cada actividad entre líneas y entre machos exitosos y no exitosos de cada línea.

El porcentaje de tiempo que fue utilizado por el macho durante el cortejo para cada actividad se muestra en la Tabla II-2.

Las diferencias en el tiempo (en segundos) empleado en cada actividad se evaluaron con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los resultados se muestran en la tabla II-3.

Tabla II-2. Porcentaje de tiempo empleado en cada actividad durante el cortejo de machos salvajes y de laboratorio con hembras salvajes en videograbaciones del cortejo.

	Mendoza		**Patagonia**	
	Exitosos	**No exitosos**	**Exitosos**	**No exitosos**
S	0.220	4.498	4.142	8.137
M	2.550	13.262	11.382	22.816
CS	12.901	48.171	21.514	49.807
CM	3.329	10.634	2.865	6.225
Fa	2.939	21.602	4.995	11.553
B	0.703	1.266	1.091	0.834
PA	0.796	0.003	0.928	0.002
VA	0.065	0.510	0.508	0.093
C	76.488	0.000	52.528	0.000
Fi	0.001	0.052	0.042	0.519
MJ	0.006	0.033	0.006	0.013

S:"stationary", M:"mobile", CS:"stationary calling", CM:"mobile calling", Fa:"fanning", B:"buzzing", PA:"peaceful attempt", VA:"violent attempt", C: "copulation", Fi:"fight", MJ:"missing jump"

Los resultados muestran que los machos no exitosos utilizan significativamente más tiempo que los machos exitosos en varias actividades, particularmente en "stationary calling" para ambas líneas. Por el contrario los machos exitosos utilizan más tiempo en "peaceful attempt", que conduce rápidamente a la cópula. También se observaron algunas diferencias entre líneas al comparar machos exitosos y no exitosos. Los machos de laboratorio exitosos emplean menos tiempo en "mobile calling" y "fanning" que los no exitosos. En contraste, las diferencias entre machos exitosos y no exitosos para estas actividades no fueron significativas en la línea salvaje. Al agrupar machos exitosos y no exitosos de cada línea las diferencias entre Mendoza y Patagonia fueron marginalmente significativas para algunas variables comportamentales. Los machos salvajes emplean más tiempo en las actividades "stationary", "mobile" y "fighting", que los machos de laboratorio. De acuerdo con estos resultados, la línea Mendoza dedica menos tiempo a actividades que no contribuyen a lograr el apareamiento rápido. Comparando las líneas basándose en la proporción de tiempo utilizada para cada actividad a lo largo de los 30 minutos del experimento por los individuos de cada línea, limitando el análisis a los individuos exitosos se puede ver en la figura II-4 que la línea salvaje emplea más tiempo en "stationary"(Fig.II-4a), "mobile"(Fig.II-4b), y "fighting"(Fig.II-4c). Respecto de "missed jump" (Fig.II-4d), el patrón es similar para ambas líneas durante los primeros 15 minutos de grabación, pero luego de ese momento no se registra dicha actividad para Mendoza pero sí para el salvaje.

En consecuencia, la cópula tiende a ser alcanzada antes por la línea de Mendoza para la cual casi todos los individuos exitosos completan la cópula antes de 20 minutos de

grabación. Para este tiempo menos del 60% de los individuos exitosos de Patagonia completaron el apareamiento (Fig. II-4e).

Comparando con el mismo tipo de gráficos individuos exitosos con no exitosos dentro de las líneas se pudieron observar diferentes patrones entre las líneas. Actividades como S (Fig.II-5c-d), M (Fig.II-5c-d), VA (Fig.II-7c-d) y Fi (Fig.II-7e-f), son menos frecuentes en Mendoza que en los salvajes. Además los individuos no exitosos utilizan más tiempo que los exitosos en S (Fig.II-5c-d), M (Fig.II-5c-d), CS (Fig.II-6a-b), CM (Fig.II-6c-d), Fa (Fig.II-6e-f) y Fi (Fig.II-7e-f). Comparando los machos no exitosos los de Mendoza realizan CM (Fig.II-6c-d) y Fa (Fig.II-6e-f) que los salvajes. Los individuos de Mendoza difieren en VA entre exitosos y no exitosos, siendo mayor en los no exitosos (Fig.II-7c), en Patagonia es al revés realizan más intentos violentos los exitosos que los no exitosos pero esta diferencia es no significativa (Fig.II-7d). Con respecto al Fi, nótese que intervienen en más peleas los machos de Patagonia que los de Mendoza, pero en ambos casos este comportamiento agresivo es mayor en los no exitosos(Fig.II-7e-f). Finalmente para ambas líneas los individuos no exitosos no realizan "peaceful attempt" (Fig.II-7a-b).

En las figuras II-8 y II-9 se puede observar gráficamente las diferencias en el tiempo empleado en todas las actividad de los machos de cada línea exitosos y no exitosos, a lo largo de los 30 minutos de observación.

Tabla II-3. Resultados de la prueba de Mann-Whitney.

	Mendoza		**Patagonia**		**Mendoza vs Patagonia**	
	Exitosos vs No Exitosos		**Exitosos vs No Exitosos**			
	Z	**P**	**Z**	**p**	**Z**	**p**
S	-2.233	**0.025**	-2.528	**0.011**	2.382	**0.017**
M	-3126	**0.002**	-2.071	**0.038**	2.733	**0.006**
CS	-4.468	**<0.001**	-3.288	**0.001**	1.346	0.178
CM	-4.048	**<0.001**	-2.341	**0.019**	-1.431	0.152
Fa	-4.215	**<0.001**	-2.161	**0.031**	-0.608	0.543
B	-1.096	0.273	0.864	0.387	-0.562	0.574
PA	5.624	**<0.001**	5.352	**<0.001**	-1.177	0.239
VA	-2.332	**0.020**	-0.779	0.435	0.087	0.931
C	5.739	**<0.001**	5.783	**<0.001**	-1.418	0.156
Fi	-2.079	**0.037**	-2.031	**0.042**	3.208	**0.001**
MJ	-0.252	0.801	-0.737	0.461	2.012	**0.044**

S:"stationary", M:"mobile", CS:"stationary calling", CM:"mobile calling", Fa:"fanning", B:"buzzing", PA:"peaceful attempt", VA:"violent attempt", C: "copulation", Fi:"fight", MJ:"missing jump"

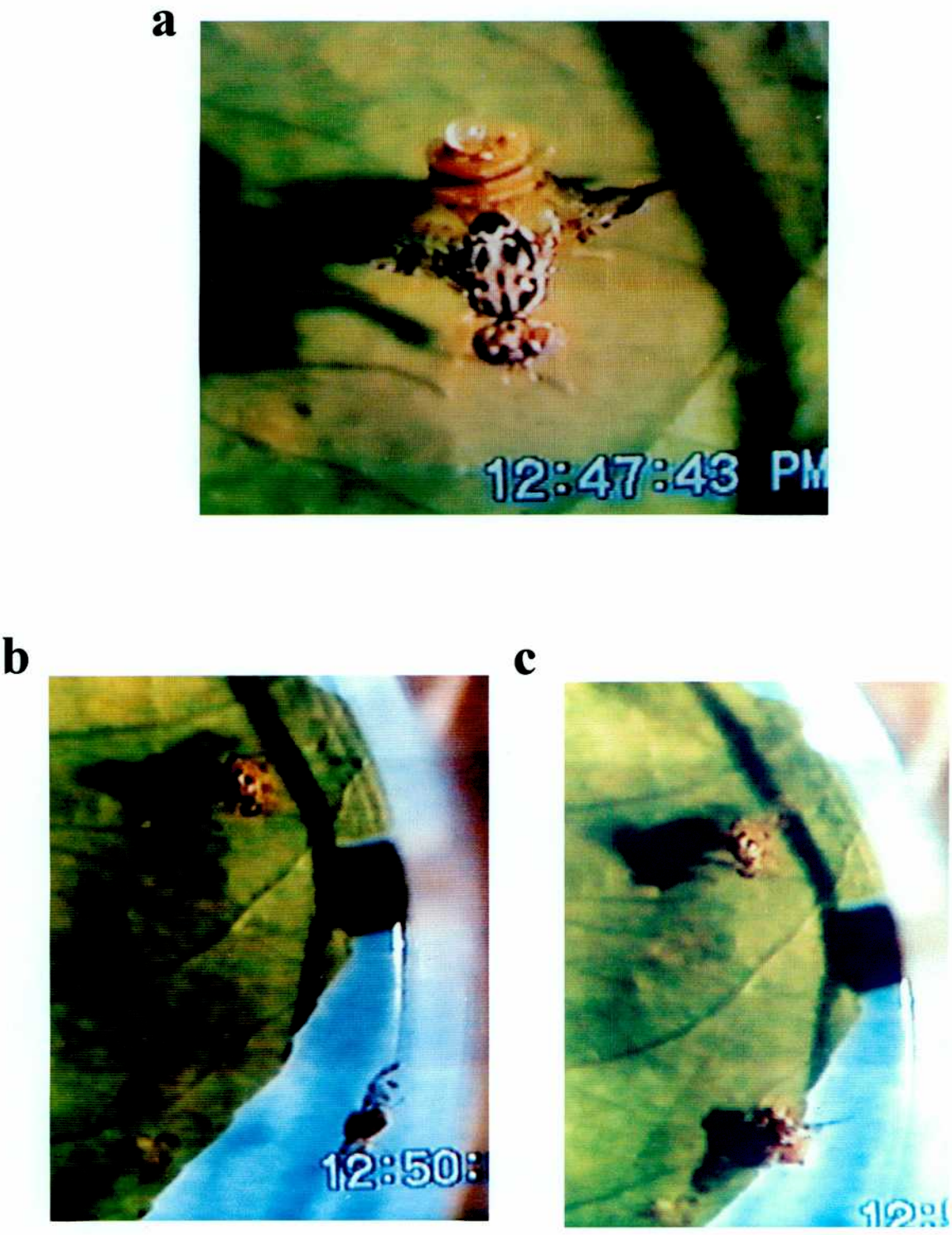


Figura II-1. Etapas del cortejo del macho: a) "Calling". b) y c) "Fanning".

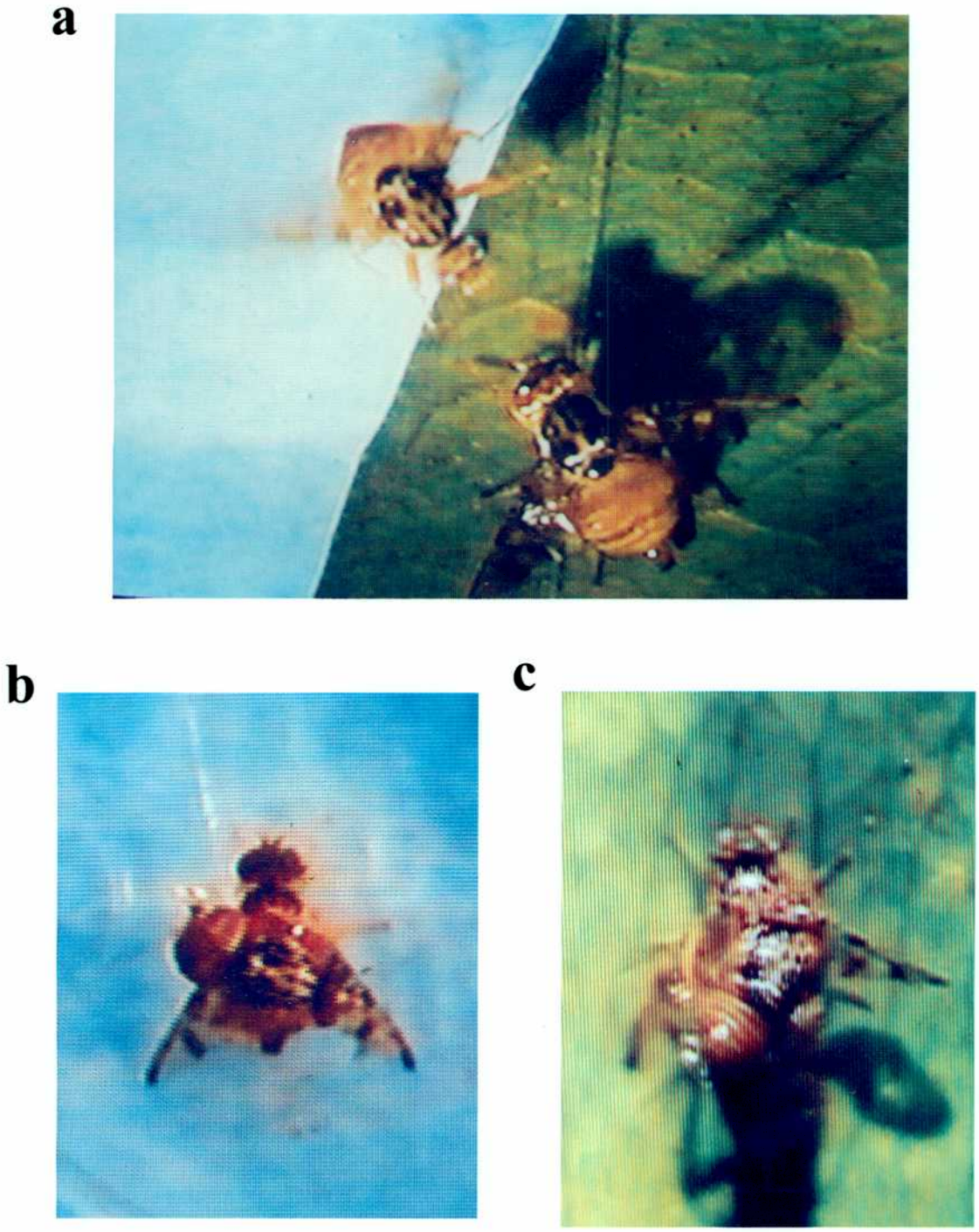


Figura II-2. Etapas del cortejo del macho: a) "Buzzing". b) y c) "Peaceful attempt"

Figura II-3. Macho y hembra en cópula. (Las fotos 1-3 fueron tomadas de la pantalla del monitor del equipo de videograbación.)

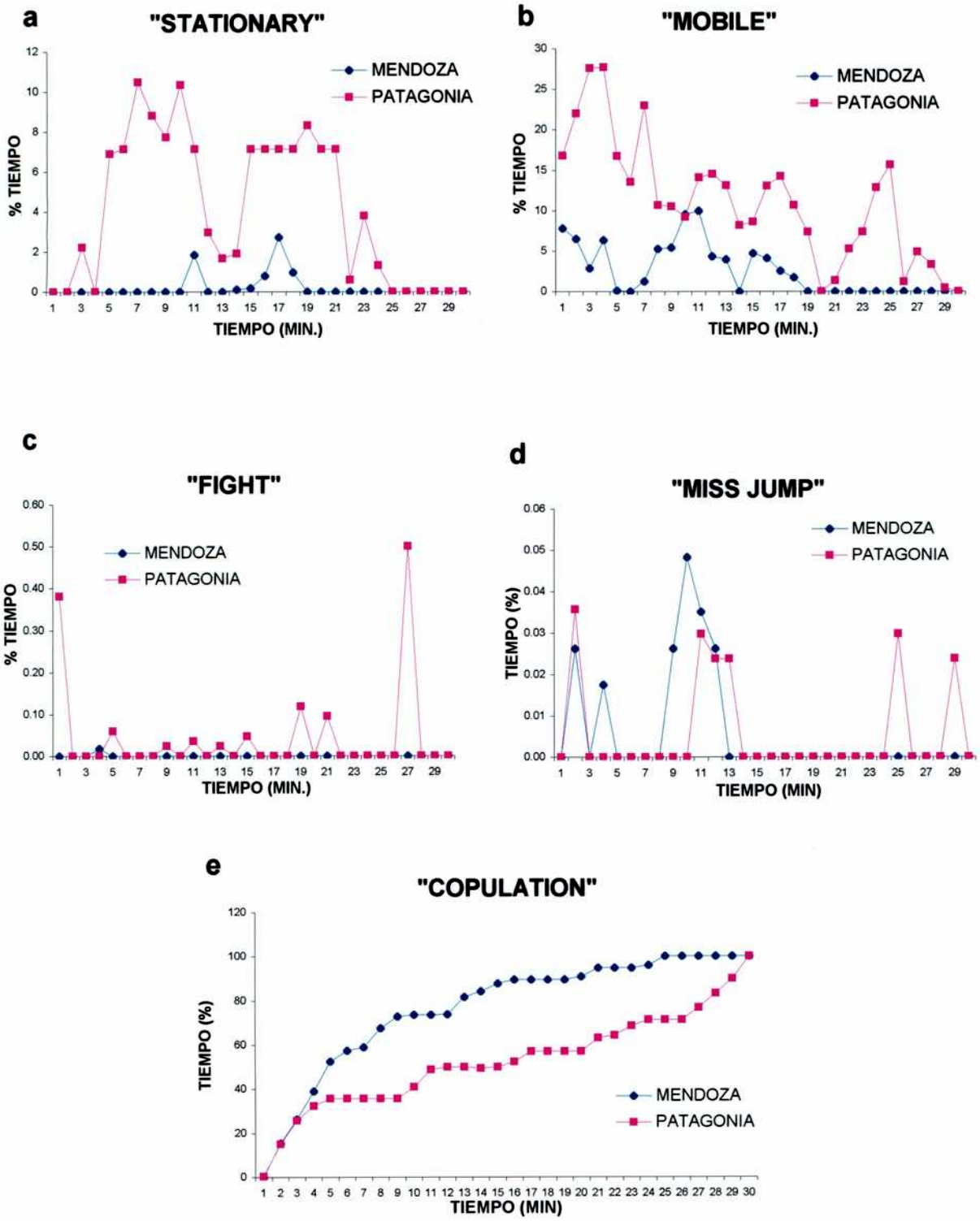


Figura II-4. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades entre los machos exitosos de las líneas Mendoza y Patagonia

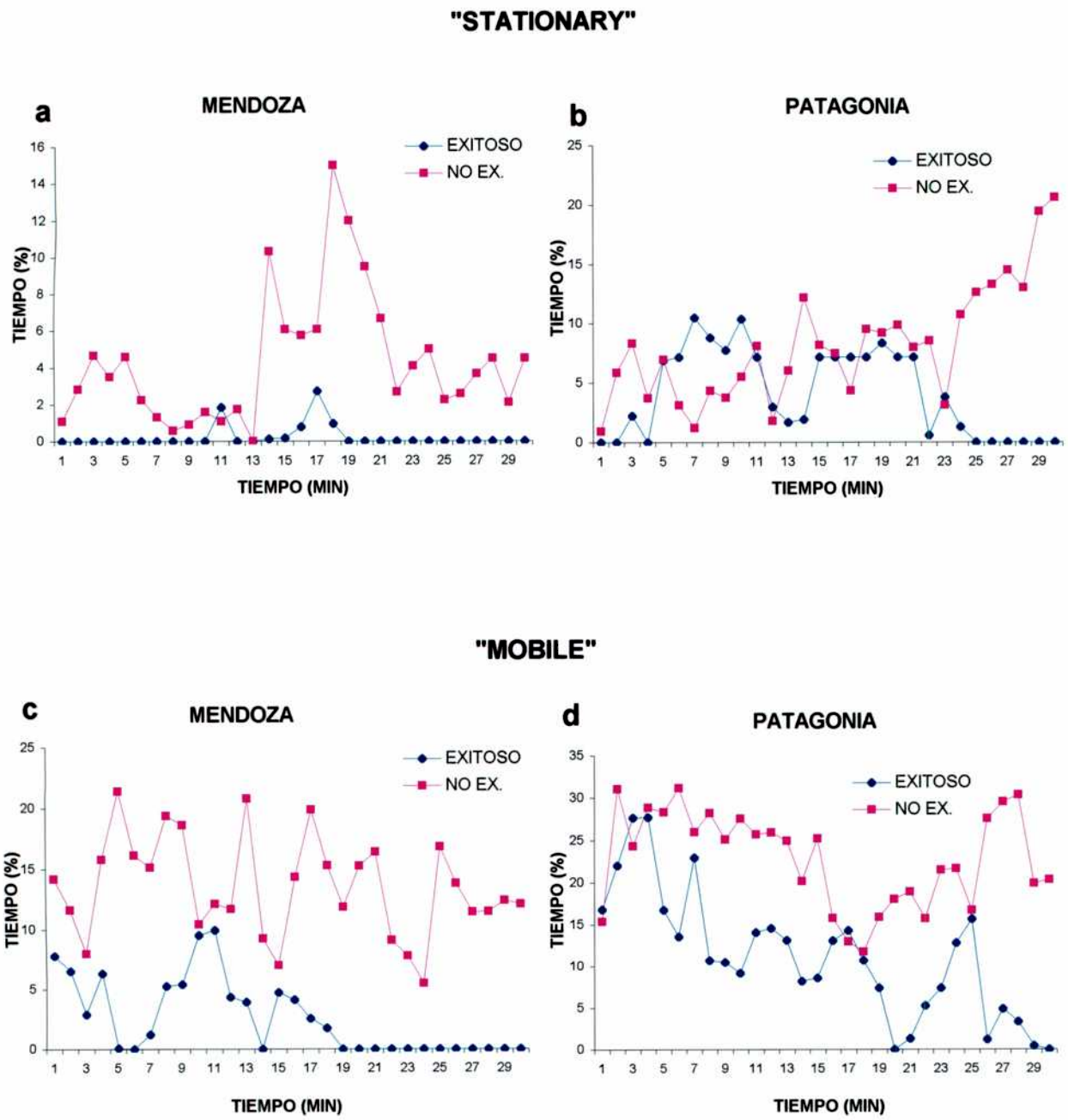


Figura II-5. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades entre los machos exitosos y no exitosos de las líneas Mendoza y Patagonia.

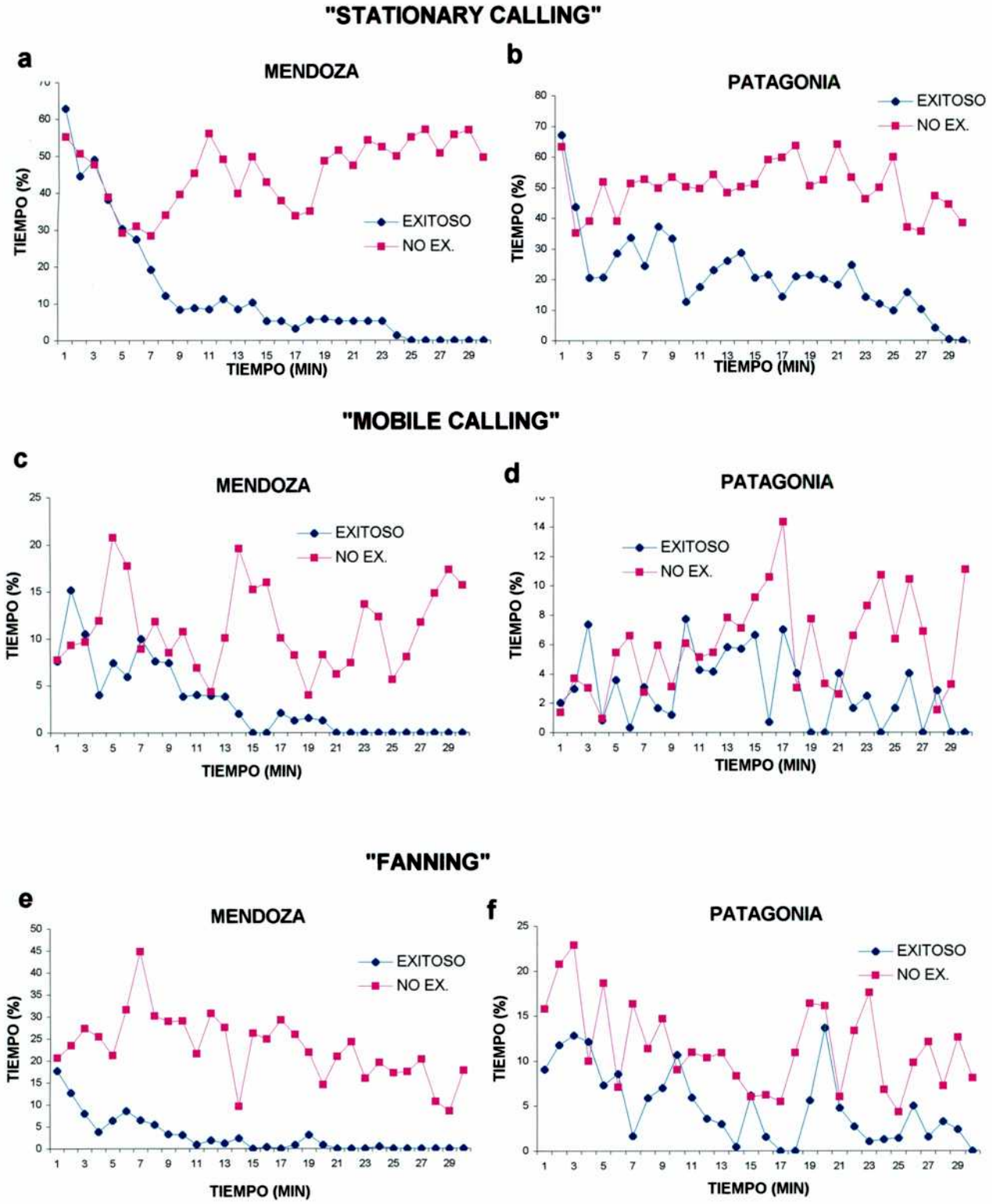


Figura II-6. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades entre los machos exitosos y no exitosos de las líneas Mendoza y Patagonia.

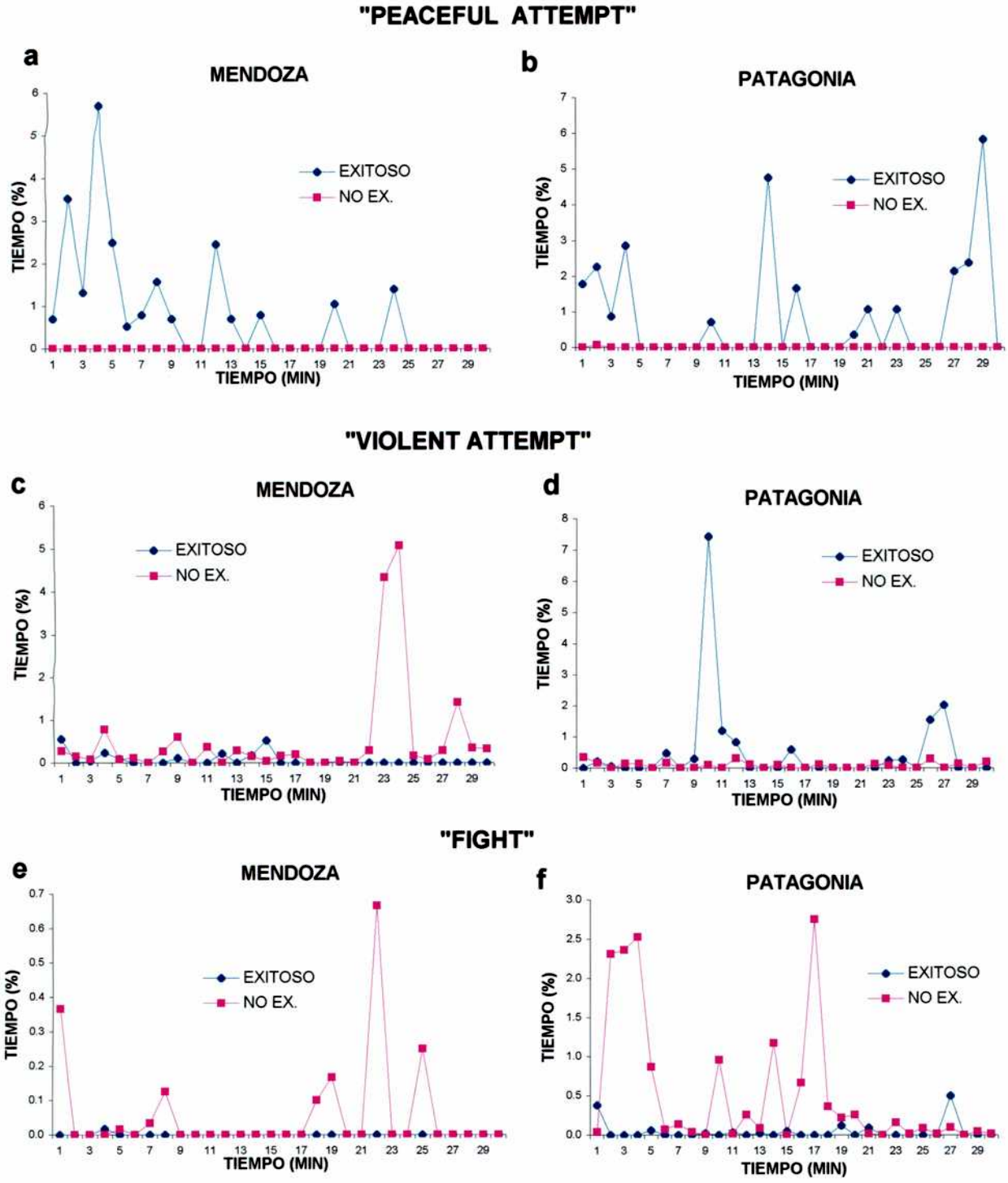


Figura II-7. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades entre los machos exitosos y no exitosos de las líneas Mendoza y Patagonia.

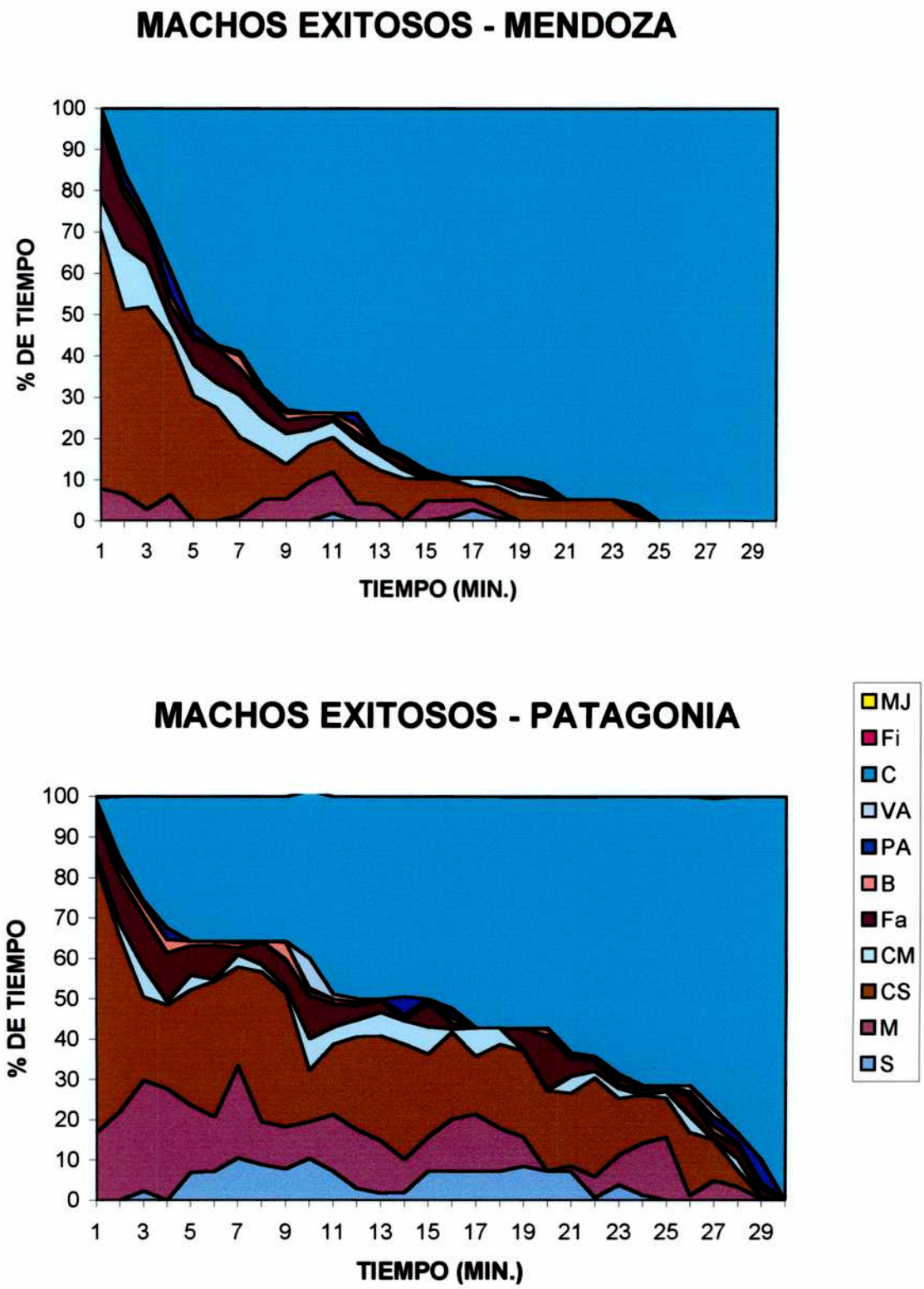
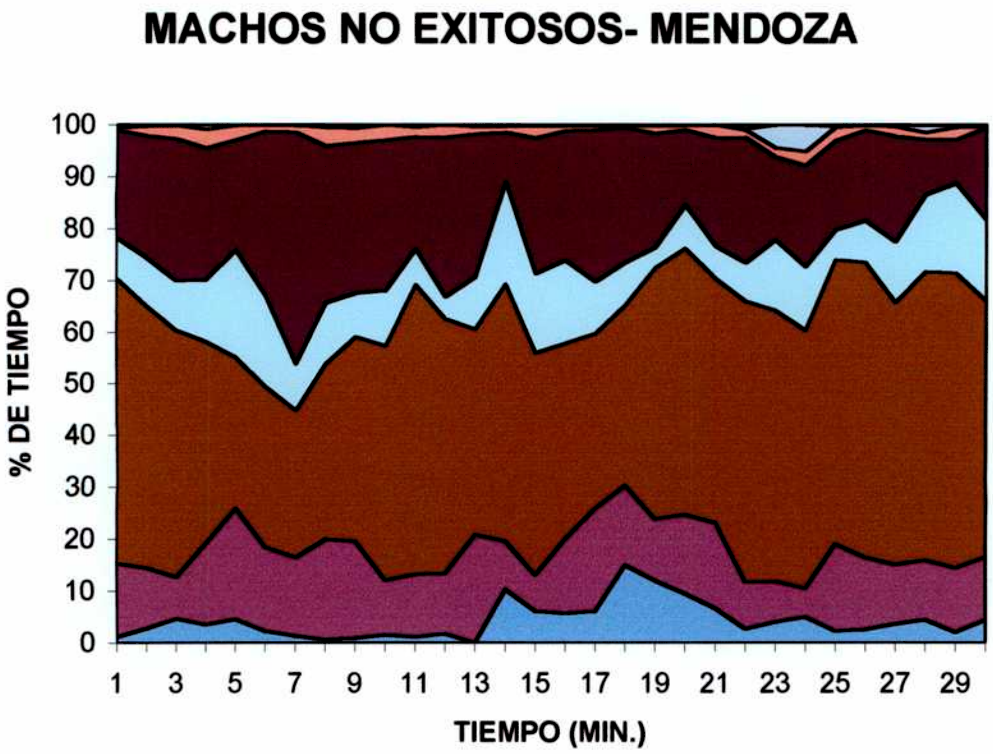


Figura II-8: Proporción de tiempo empleado en cada actividad por los machos exitosos de Mendoza y Patagonia.



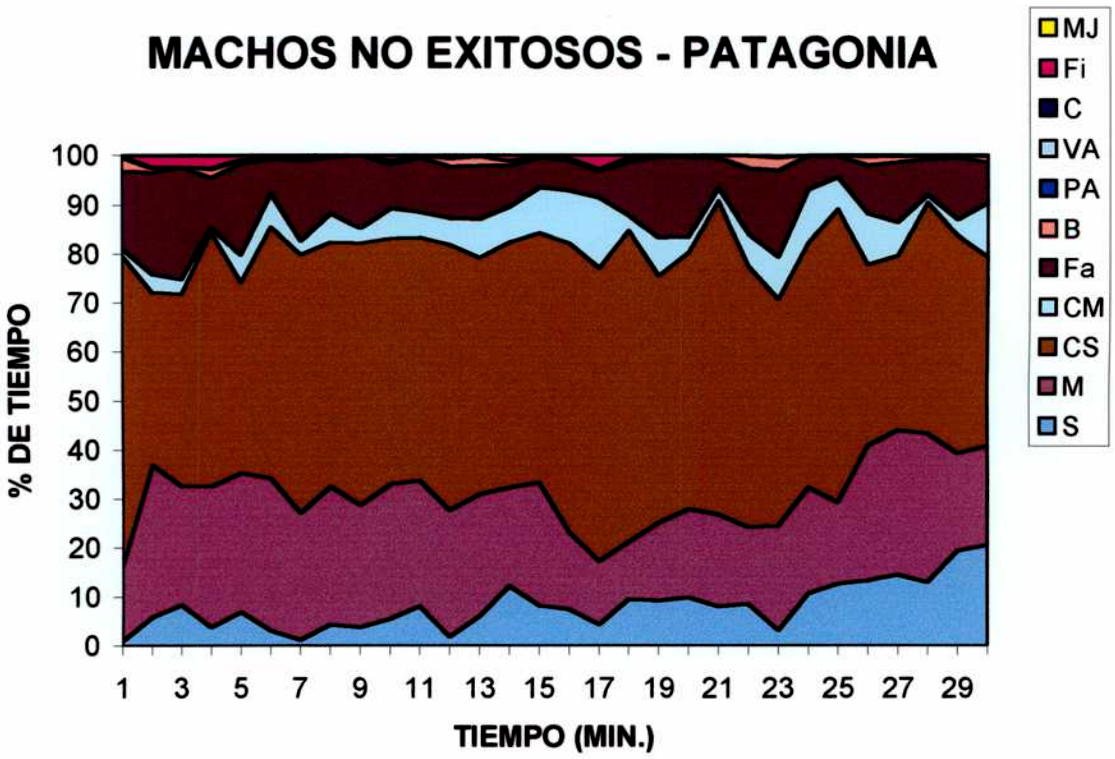


Figura II-9: Proporción de tiempo empleado en cada actividad por los machos no exitosos de Mendoza y Patagonia.

2.4 DISCUSION

2.4.1 Cortejo

Por medio de las videograbaciones se logró observar el cortejo de forma más ampliada y se pudo describir con más detalle las etapas del cortejo descriptas por Féron (1962).

De acuerdo con los presentes resultados el éxito copulatorio depende en gran medida de la motivación sexual inicial del macho (expresada por "calling"-atracción de la hembra). Ocurre una respuesta más agresiva de la hembra, incluyendo "peleas", cuando ella encuentra un macho no motivado, que no está llamando (Calcagno et al., 1999). En el presente trabajo como los machos estaban solos en las cajas de apareamiento no tenían el estímulo de otros machos, pero igual realizaban el "calling". Nakagawa (1973), comprobó que los machos liberan feromona en ausencia de otros machos. Sin embargo, Mc Donald (1987) vio que la estimulación visual de otros machos cerca induce el calling . Según este autor el estímulo visual podría estar combinado con el auditivo. Sin embargo, el corte de antenas que remueve presumiblemente el sentido olfatorio y auditivo no reduce el número de calling en los machos en cajas pequeñas (Nakagawa et al. 1973). Por lo tanto la inducción del "calling" sería un proceso muy complejo.

Parece que ocurre un verdadero "dialogo" entre macho y hembra durante el cortejo, porque por medio del videoanálisis se puede observar una secuencia integrada de comunicación entre ambos. Presumiblemente el macho libera feromona durante el "calling", al exponer la gota de feromona rodeada por epitelio rectal (Arita y Kaneshiro 1986). Durante el "mobile calling", al desplazarse algunas veces toca la hoja con la gota presumiblemente para depositar feromona (Prokopy y Hendrichs 1979). En otros grupos de tefrítidos como especies de *Anastrepha* los machos depositan directamente la

feromona sobre la hoja y la misma se acumula allí (Aluja et al. 2000). Las hembras receptivas responden al olor de la feromona del macho volando o caminando hacia la hoja donde él se encuentra. Cuando esto ocurre el macho se vuelve hacia ella e inmediatamente comienza el "Fanning". En esta etapa probablemente el macho dirige la feromona hacia la hembra por medio de una corriente de aire (Arita y Kaneshiro 1989). El efecto que produce la remoción de las alas sobre el éxito copulatorio del macho (Keiser et al. 1973) está acorde con la idea de que la estimulación de la hembra con la feromona enviada por movimientos del aire debe ser importante. Sin embargo esto no es definitivo porque la remisión de las alas produce también cambios en los estímulos auditivos y visuales (Keiser et al. 1973). Presumiblemente la misma feromona es emitida durante el "calling" y fanning", pero no hay estudios de la composición de la misma en distintas etapas del cortejo.

Durante las filmaciones se pudo grabar el sonido producido por el macho durante el "Fanning". Este es un zumbido continuo y su significado de estímulo a la hembra no ha sido estudiado. El mismo es producido por vibración continua de las alas y puede inducir a al hembra receptiva a moverse hacia el macho. En los videos se observó que en proximidad de la hembra el macho comienza el "fanning" pero a veces también lo realiza sin su presencia. Esta actividad es disparada en los machos por un estímulo visual ya que como vieron Arita and Kaneshiro (1989) en el campo, la sombra de la hembra en la cara adaxial de la hoja produce el inicio del "fanning" en el macho. Algo similar se observó en las videograbaciones. Cuando el macho veía proyectada la imagen de la hembra sobre la hoja comenzaba el "fanning", aunque esta se encontrara en otra parte de la caja de apareamiento. En *A. suspensa* (Sivinski y Webb 1986), el macho modula el zumbido con la proximidad de la hembra.

Los pulsaciones frecuentes de la pleura abdominal que se observaron durante el "Fanning" en las imágenes de video también fueron vistos por Briceño y Eberhard (IAEA 1999). Arita y Kaneshiro (1989) propusieron que las regiones de la pleura *abdominal* expandida del abdomen formaban un canal físico a través del cual corría la feromona , pero la misma expansión se produce durante el "calling",cuando las alas no vibran, lo que va en contra de esta explicación. Parecería que la función de la pleura abdominal expandida es exudar los productos glandulares sobre la superficie del abdomen como en otros tefrítidos (Hendrichs y Goeden 1994).

Con la hembra ya enfrentada el macho cambia bruscamente de "Fanning" a "Buzzing". Tal vez durante esta etapa, debido a que como se vio en las imágenes de video el epitelio rectal se retrae, no se liberen feromonas de las glándulas anales como planteaban Arita y Kaneshiro (1986). Como durante esta etapa se producen intensos sonidos, es posible que la hembra sea estimulada auditivamente por el zumbido intermitente. En esta fase tampoco hay estudios hechos sobre la importancia del sonido en la estimulación de la hembra como por ejemplo fue hecho en *A. suspensa* por Sivinski et al (1984).

Otros estímulos posibles, no analizados, incluyen visión, olfato y corrientes de aire. Con respecto a este último en los videoanálisis se observó el movimiento de los bordes de las alas de las hembras por cada zumbido intermitente del macho durante el "buzzing", demostrando esto que este comportamiento produce movimiento de aire hacia la hembra. Los movimientos de rotación de cabeza del macho que acompañan al "buzzing" podrían se un despliegue visual hacia la hembra, ya que la setas espatuladas del macho por la rotación podrían dar cierta imagen a la hembra.. También el dimorfismo sexual del color de los ojos del macho y el área blanca de pubescencia en la

superficie anterior de la cabeza del macho (Holbrook et al. 1970; Landont et al. 1992) podrían ser despliegues visuales hacia la hembra durante la rotación de la cabeza. Sin embargo, no ha sido demostrado que estos colores tengan efecto sobre la hembra.

Durante el intento de cópula se observó que el macho frota el abdomen de la hembra con sus patas traseras cuando tiene dificultades para la intromisión. Esto sería un aparente estímulo para que ella levante el abdomen como se propuso para otros tefrítidos (Headrick y Goeden 1994).

Los movimientos del macho sobre la hembra durante la cópula vistos en los videos, probablemente representen un cortejo copulatorio (Eberhard 1991). Si esta interpretación es correcta, esto implicaría que en esta especie ocurriría algún tipo de elección críptica de la hembra (Eberhard 1994).

Como se pudo ver en los análisis el tiempo empleado en las distintas etapas del cortejo varía entre machos. Además según Rolli (1976) hay variación individual en los sonidos producidos por los machos. Puesto que las hembras pueden preferir machos de fenotipos menos comunes (Rössler 1980), la variación en rasgos comportamentales podría ser biológicamente importante.

2.4.2 Comparación de moscas de cría masiva con salvajes

De acuerdo con los presentes resultados aparentemente hay diferencias importantes entre líneas que podrían tener influencia en el proceso copulatorio en condiciones diferentes de las correspondientes al experimento. En particular, la línea de Mendoza derrocha menos tiempo en actividades que aparentemente no conducen a la cópula. En las condiciones experimentales correspondientes al presente estudio, un macho

rechazado tiene una segunda oportunidad durante el período de grabación para ser aceptado por la hembra sin competición con otros machos. Esta situación podría explicar por qué la proporción de individuos exitosos no difiere entre líneas. Sin embargo, el gráfico de proporciones del tiempo dedicado a la cópula a lo largo del tiempo parece indicar que la línea de Mendoza tiende a arribar a la cópula más rápidamente. En esta línea los individuos exitosos pasan velozmente de "CS" a "C" pasando por un corto "Fa", "B" y "PA", mientras que en los individuos de Patagonia el patrón parece ser mas disperso con múltiples retrocesos de la secuencia correcta (ej. "B" a "Fa", "Fa" a "CS" y así sucesivamente). La transición entre los distintos pasos de el cortejo en la naturaleza es modulado por una integración con las respuestas de la hembra (Lux et al. 1997). En condiciones de cría masiva el cortejo es siempre simplificado y los machos no interpretan la no receptividad de la hembra como señal de interrumpir el cortejo por eso como los resultados lo indican los machos de cría masiva realizan más intentos violentos que no terminan en cópula. En un trabajo en que se analizó el comportamiento de las hembras (Calcagno et al. 1999), se concluyó que las hembras enfrentadas a machos de cría masiva se mueven más y permanecen menos tiempo quietas cuando están cara a cara con el macho durante el "B" que las que se acercan a un macho silvestre. Esto también fue observado por Liimatainen et al (1997), el comparó en *C. capitata* el comportamiento de las hembras salvajes enfrentadas con machos de cría masiva y silvestres.

Desviaciones del comportamiento en el cortejo de los machos de cría masiva fue documentado en la mosca del Mediterráneo (Shelly 1996; Liimatainen et al. 1997). Un caso extremo de desviación del comportamiento de cortejo fue encontrado en la mosca de la fruta de Méjico (Moreno et al. 1991), los machos de cría masiva sustituían el

cortejo con lo que los autores describieron con "apareamiento agresivo", como consecuencia los apareamientos eran con hembras de cría masiva.

A través de la colonización en laboratorio, los machos de tefrítidos acortan el cortejo para disminuir las frecuentes interrupciones que se producen por el hacinamiento. Esto fue observado en la mosca del melón (Hibino y Iwahashi 1991) y también fue demostrado en *C. capitata*, por Eberhard y Briceño (1996), quienes encontraron una correlación entre el acortamiento del cortejo y el número de generaciones bajo cría masiva. En laboratorio mientras se acorta el cortejo del macho, la discriminación de la hembra también va disminuyendo en un tipo de proceso Fisheriano (Briceño 2000).

Las condiciones de cría masiva están caracterizadas por una drástica reducción de espacio disponible por una gran densidad de individuos y carecen de requerimientos naturales (formación de leks, frutos). Tal vez la cría masiva favorece un rápido apareamiento con reducción del cortejo y seguramente incrementa la tolerancia a las condiciones artificiales mencionadas con respecto a las salvajes. Las hembras reducen el poder de elección de pareja y los machos abandonan la defensa territorial porque el costo de rechazo a los intrusos se hace demasiado alto. Obviamente, estas adaptaciones podrían ser perjudiciales una vez que estos machos de laboratorio se enfrenten con machos de campo en leks y estén sujetos al escrutinio de las hembras de campo. Se observó también, como indican los resultados, que los machos de cría masiva son menos agresivos que los salvajes, esto puede deberse a que en condiciones de altas densidades disminuye la "irritabilidad" de los individuos debido a las constantes interacciones entre ellos. Esto lleva a un decrecimiento de los niveles de "irritabilidad" (Boller y Calkins, 1984).

Las condiciones para la grabación en cajas pequeñas se asemeja más a las condiciones de cría masiva. Es posible por lo tanto que los machos de Mendoza sean favorecidos por dichas condiciones. Ya que la competencia en el apareamiento de los tefrítidos de cría masiva depende de las condiciones del experimento. Cuando los adultos de cría masiva son analizados bajo condiciones de laboratorio ellos son relativamente más competitivos en el apareamiento que los salvajes (Seomori et al. 1980; Nakamori 1987). Bajo condiciones de campo o de jaulas de campo la competitividad de los tefrítidos de cría masiva se ve reducida (Shelly y Whittier 1996)

Los resultados indican claramente el papel de la motivación sexual del macho en la probabilidad de ser aceptado por la hembra y arribar a la cópula. Dicha motivación depende de la madurez de los individuos, duración de la privación sexual, dieta y otros factores. Como los machos de cría masiva utilizados en este estudio fueron de la misma edad que los salvajes, su motivación sexual puede haber sido mucho más alta que los salvajes. Se ha observado que las moscas de cría masiva maduran más tempranamente debido a que la dieta artificial de larva tiene altos niveles de nutrientes lo que hace que el adulto emerja con altas reservas de energía (Rossler 1975; Dridi 1990). Se vio a través del proceso de colonización de laboratorio de una población salvaje, luego de 3 o 4 generaciones bajo cría masiva, que el período de maduración presexual de las moscas fue significativamente acortado cuando fue comparado con la población silvestre original (Dridi 1990). Por lo tanto, los machos de Mendoza fueron favorecidos por las condiciones ambientales reducidas más aceptable para ellos y por una mayor motivación sexual.

Si en condiciones más realistas que las correspondientes al presente estudio, la rapidez con que el macho alcanza la cópula se mantiene en los valores esperados, el origen de la

ventaja observada sería la selección sexual producida como respuesta a las condiciones particulares de la cría masiva.

La selección por caracteres poligénicos, tales como aquellos que determinan el comportamiento sexual, ocurre gradualmente durante varias generaciones. Por eso es importante conocer si este proceso de selección artificial en el laboratorio produce cambios comportamentales heredados suficientemente importantes como para determinar incompatibilidad entre la colonia de laboratorio y las moscas salvajes. Una evaluación permanente de este proceso permitiría corregir la situación tempranamente. Por lo tanto se requiere de un cuidadoso entendimiento del criterio de apareamiento.

Como las moscas de cría masiva son generalmente de líneas viejas y las diferencias en el éxito sexual son probablemente asociadas con diferencias genéticas (Eberhard 2000). Una selección inadvertida en las jaulas de cría masiva aparentemente tiene resultados en un cambio en el comportamiento del cortejo del macho. Una importante consecuencia de esta interpretación es que ayuda a responder el cuestionamiento hecho por Lancé y McInnis (1993) proponiendo la existencia de variación genética en la habilidad del cortejo del macho y de la utilización apropiada de modelos de selección sexual para tomar decisiones sobre el control de las poblaciones de esta plaga (ej. Boake et al. 1996).

Eberhard (2000) plantea el caso de "resistencia comportamental". La resistencia comportamental de una población salvaje a aparearse con una línea de cría masiva puede constituir el último cambio en el comportamiento sexual de una línea de cría masiva. Este proceso ha sido informado dos veces en tefrítidos: en la mosca del melón en la Isla de Okinawa, Japón (Hibino y Iwahashi 1991) y en la mosca del Mediterráneo en la Isla Kauai, Hawai (McInnis et al. 1996). En estos dos casos las hembras salvajes

fueron capaces de identificar a los machos liberados y rechazarlos para el apareamiento. En el caso de la mosca del melón, la reducción del cortejo probablemente fue la causa de la "resistencia" (Hibino y Iwahashi 1991). En el caso de la mosca del Mediterráneo en Hawai la línea utilizada tenía 38 años de laboratorio (McInnis et al. 1996), la calidad comportamental de las moscas estériles probablemente se habría deteriorado y la línea habría divergido comportamentalmente de sus contrapartes salvajes. La presión de selección por liberaciones prolongadas podría haber inducido en las hembras salvajes la capacidad de reconocer los machos liberados y conducir a la no competitividad de estos con los salvajes por el apareamiento con las hembras del campo. Sin embargo luego de la finalización de los programas de liberación, se encontró que las hembras salvajes perdieron su habilidad de reconocer los machos liberados como tales (McInnis, comunicación personal), lo cual sugiere que no habría ocurrido "resistencia" por selección sobre las moscas salvajes sino reducción de calidad de la línea de cría masiva. El problema de "resistencia al comportamiento" se puede resolver dedos maneras: Aumentando el número de moscas liberadas o con la colonización de una nueva línea a partir de pupas salvajes. En Okinawa, donde se aplicó la primera solución, la mosca del melón fue erradicada exitosamente en 1993 (Ito and Kakinokana 1995). La posibilidad de que las moscas desarrollen resistencia al apareamiento muestra firmemente la importancia práctica de regular el reemplazo de líneas para utilizar en los programas de la TIE.

Los resultados del presente trabajo parecen confirmar compatibilidad entre las líneas pero las conclusiones sobre competencia en el apareamiento no son definitivas. Por ello se hace necesario realizar experiencias en jaulas de campo para determinar si las

diferencias se mantienen en condiciones más similares a las de las poblaciones naturales Mc. Innis et al. 1996; Cayol et al. 1999).

Los efectos de la irradiación sobre el comportamiento sexual de C. capitata: Análisis en jaulas de campo y por videograbaciones

3.1. INTRODUCCION

El éxito en el apareamiento de los de los insectos esterilizados es quizá el factor más importante para el éxito de un programa de control genético de esta plaga. Los efectos dañinos de la radiación ionizante usada para esterilizar fueron reconocidos desde los primeros días de la TIE (Knipling 1979).

Es sabido que la irradiación utilizada para producir esterilidad sexual no actúa específicamente sobre el sistema reproductor, sino que, dependiendo de la dosis empleada, también afecta distintas funciones del organismo (Favret et al. 1995). Haish (1969) informó que moscas que habían recibido altas dosis mostraban reducido su metabolismo alimentario por lo que disminuía la longevidad de los adultos. Asimismo la irradiación provoca una reducción de la respuesta olfatoria que concluye en una reducción de la ingestión de alimento por ambos sexos y en una reducción significativa sobre la ingestión de proteína hidrolizada por las hembras y consumo de azúcar por los machos (Galun et al. 1985).

Zumreoglu et al. (1979) encontraron que moscas del Mediterráneo irradiadas en el estadio de pupa con dosis de 10 Krad reducían significativamente su producción de feromonas, factor esencial en los machos para el logro del apareamiento. Por otro lado Heath et al. (1994) informaron que la radiación gamma no afecta la cantidad total de

feromona producida a lo largo del día por machos de *C. capitata*, pero sí afecta la proporción de los componentes de la mezcla de feromona.

Uno de los principales problemas cuando se irradian los insectos para la técnica del macho estéril es conocer la edad óptima de los cultivos. La sensibilidad a los rayos gamma varía a lo largo del ciclo de vida y, en consecuencia, también varía la eficiencia de la esterilización y el estado físico de los animales a liberar según el momento en que se los irradie. Cada laboratorio sincroniza los cultivos y determina el momento de irradiación de acuerdo con sus propias condiciones de crianza normalizadas (Rabossi et al. 1994).

Las pupas más jóvenes en ésta como en otras especies son más sensibles a la radiación pero los efectos son menos específicos produciendo deterioros en otros procesos diferentes al sistema reproductivo (Zumreoglu et al. 1979). Estos deterioros disminuyen la capacidad de aparearse de los individuos con las hembras de la naturaleza que, consecuentemente se aparearán machos fértiles (Favret et al. 1995).

Análisis preliminares (Favret et al. 1995) indican que la radiación provoca no sólo una reducción en la capacidad de apareamiento sino también en la transferencia de esperma (Favret et al. 1995). Esto último es importante porque no basta conque los machos estériles liberados sean capaces de aparearse con las hembras de la naturaleza, sino que además, deben ser capaces de transferir su esperma (aunque sea defectuoso). Si no lo hicieran, las hembras se seguirán apareando hasta encontrar un macho, fértil o no, que complete su reservorio de esperma, haciendo fracasar el método (Manso y Lifschitz 1992).

Se han demostrado diferencias en la sensibilidad a la radiación en machos y hembras en *C. capitata.* Algunos autores sostienen que la hembra es más resistente a la radiación

que el macho (Féron y Sermente 1963) mientas que otros dicen lo opuesto (Katiyar 1962; Féron 1966). La edad fisiológica de las pupas puede variar al momento de la irradiación y algunas hembras pueden tener ya algunos huevos desarrollados (Williamson et al. 1985). Estos resultados indujeron a incrementar las dosis de irradiación para evitar que se liberen hembras portadoras de huevos fértiles y, en consecuencia, una infestación adicional. Pero los machos sometidos a ese tratamiento sufren una severa atrofia de sus gónadas, reduciendo su capacidad para competir con los machos normales. Por la tanto la eliminación de las hembras antes del momento de la radiación ionizante es de gran interés en los programas de control (McInnis 1985).

Es importante el conocimiento de los efectos nocivos de la radiación para la optimización del control de esta plaga por medio de la TIE. En particular, se requiere el estudio de la dosimetría biológica de la radiación a aplicar de manera de lograr el mejor equilibrio entre la esterilidad inducida y los efectos perjudiciales sobre diversos aspectos, tales como su capacidad para competir eficientemente por el apareamiento en condiciones de campo.

En este experimento se analizaron los efectos de la radiación sobre los componentes del comportamiento reproductivo, en una línea de cría masiva bajo dos condiciones diferentes: en jaulas de campo y por videograbación.

3.2 MATERIAL Y METODOS

3.2.1 Experimento de Videograbación.

El material biológico utilizado fue de la línea Mendoza de laboratorio (ver capítulo II). Esta línea fue criada en el IG/ CNIA/ INTA Castelar hasta el estadio de pupa.

Para este experimento se utilizaron machos vírgenes irradiados y no irradiados enfrentados siempre con hembras no irradiadas.

Parte de las pupas se irradió, 48hs. antes de la eclosión, con una fuente de emisión de rayos X, con un equipo Phillips. El resto de las pupas se dejó sin irradiar como testigo. La dosis aplicada fue 14000rad., una dosis alta de irradiación equivalente a la utilizada por los programas de control y erradicación de la plaga. Las pupas fueron trasladadas al Laboratorio de Genética de Poblaciones en Ciudad Universitaria, donde se colocaron en una cámara de cría. Todos los días los imagos emergidos se separaron por sexos antes de cumplir las 24 horas de edad con el fin de obtener moscas vírgenes, los machos se colocaron en frascos de 400 ml en forma individual. Las hembras irradiadas fueron descartadas y las no irradiadas fueron colocadas de a 5 por frasco de 400 ml. Las moscas se envejecieron hasta la edad de 9-10 días en la cámara de cría obteniéndose así individuos sexualmente maduros y de igual edad para evitar errores en la proporción de éxito copulatorio atribuibles a diferencias de maduración.

El experimento se realizó entre los meses de julio y septiembre de 1996. El numero total de grabaciones fue de 80, 40 correspondientes a machos irradiados y 40 no irradiados.

Cada mañana se colocaban 5 machos de uno de los dos grupos en sendas cajas de apareamiento. El tipo de macho se alternaba de un día a otro. Luego de que un macho llamara continuamente durante 5 min. se liberaba una hembra virgen en su caja y se comenzaba a grabar. Cada día se realizaron dos grabaciones del mismo tipo de macho.

Métodos estadísticos

Se comparó el tiempo empleado en las diferentes actividades del cortejo para individuos irradiados y no irradiados utilizando la prueba de Mann-Whitney.

3.2.2 Experiencias en jaulas de campo:

Se realizaron dos experimentos semejantes que difirieron en el tipo de radiación empleada:

3.2.2.1 Radiación X

Se utilizó la misma línea de cría masiva del experimento de videograbación.

Las pupas fueron irradiadas 48hs. antes de la eclosión. Igual que en el experimento anterior se aplicaron rayos X. Las dosis aplicadas fueron 14000rad, 7000rad y 3500rad y se dejó un grupo sin irradiar (testigo), 0 rad.

Luego de 24 hs de emergidos, los imagos se separaron por sexo. Los machos se colocaron en frascos de 400 ml a una densidad de 10 individuos por frasco, todos ellos con la misma dosis de radiación. Las hembras irradiadas fueron descartadas y las no irradiadas fueron colocadas de a 30 en frascos de 400 ml. Las moscas se envejecieron hasta la edad de 9-10 días.

Los machos fueron marcados con diferentes colores según la radiación recibida.

El experimento se realizó entre el 30 de abril y el 9 de mayo de 1996 y constó de 8 repeticiones.

Cada día a las 8:00 hs de la mañana se liberaron en la jaula de campo 30 machos vírgenes de cada grupo (14000rad, 7000rad, 3500rad, 0rad). A las 9 hs se liberaron 30 hembras vírgenes sin irradiar. Luego a cada hora se ingresó en la jaula, entre las 10 y 14 hs. (5 observaciones), coincidiendo con el período de mayor apareamiento (Capitulo I), para extraer las parejas formadas. Se registró número de parejas en cópula y el grupo al que pertenecían (dosis de radiación) los machos apareados. También se registró la ubicación de la pareja (árbol o red). Cada día, al finalizar la experiencia (16 hs.), se retiraron todos aquellos individuos que no copularon durante el período de observación.

3.2.2.2 Rayos gamma

El material biológico utilizado fue la cepa de cría masiva Mendoza. Esta línea fue expandida en el Laboratorio de Genética de Poblaciones de la FCEN con el fin de obtener suficiente número de moscas para este experimento.

La irradiación de las pupas se realizó con un irradiador Gammacell 220 (fuente de ^{60}Co) de la Unidad de Actividad Aplicaciones Tecnológicas y Agropecuarias, en el Centro Atómico Ezeiza. La dosimetría se realizó con dosímetros de referencia Fricke (intervalo de eficiencia 30-400 Gy).

Los tratamientos fueron: 0 Gy (testigo), 70 Gy, 100 Gy y 140 Gy. Las condiciones de irradiación fueron temperatura ambiente e hipoxia.

Las pupas fueron irradiadas 48 hs. antes de la eclosión y luego trasladadas al Laboratorio de Genética de Poblaciones en Ciudad Universitaria, donde se colocaron en la cámara de cría. Los adultos emergidos se colocaron en grupos de 30 en frascos de 2750 ml, separados por tratamiento y por sexo. Las moscas se envejecieron hasta la edad de 10±1 días en la cámara de cría obteniéndose así individuos sexualmente maduros y de igual edad, para evitar errores en la proporción de éxito copulatorio atribuibles a diferencias de maduración. Los machos irradiados con diferentes dosis fueron identificados mediante diferentes colores.

El experimento se realizó entre el 5 y 13 de mayo y entre el 19 de octubre y 3 de diciembre de 1999 y constó de 15 repeticiones. Cada día a las 8:00 de la mañana se liberaron en la jaula 30 machos de cada grupo. A las 9:00 hs. se liberaron 30 hembras vírgenes sin irradiar. A partir de ese momento se ingresó a la jaula cada 30 min. entre las 9:30 y 14 hs. (10 observaciones) para extraer las parejas en cópula. Se registró el número de parejas en cópula para cada tratamiento como así también la ubicación de la

pareja en el árbol. Las parejas fueron extraídas cuidadosamente para que no se separaran y colocadas individualmente en frascos de 300ml a la sombra para contabilizar el tiempo de cópula. La temperatura, humedad e intensidad de luz fueron registradas en cada observación.

En 6 de los ensayos, al final del día las hembras apareadas fueron agrupadas en frascos según el tipo de macho con el que habían copulado. Se colocaron en cámara de cría con frutas artificiales para que ovipongan. A cada grupo se le extrajeron huevos 3 veces cada 48 hs. Dichos huevos se colocaron en cajas de petri sobre un papel de filtro, con un paño húmedo debajo y se contó el porcentaje de huevos eclosionados a las 48 hs.

Análisis estadístico

Para comparar los tiempos de cópula se utilizó una prueba ANOVA y las comparaciones de a pares se hicieron mediante contrastes de Scheffé

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Experimento de videograbación

Con el análisis de las videograbaciones se reconocieron las actividades del cortejo del macho y se caracterizó el patron de cortejo de 40 machos irradiados y 40 no irradiados. Las frecuencias absolutas de machos exitosos y no exitosos se muestra en la TablaIII-1. La proporción de machos exitosos difiere significativamente entre machos irradiados y no irradiados (χ^2= 5, P= 0.025).

Cuando se analizó el tiempo empleado en cada actividad se observaron diferencias entre machos irradiados y no irradiados y entre exitosos y no exitosos. El porcentaje de

tiempo que fue utilizado por el macho durante el cortejo para cada actividad se muestra en la Tabla III-2.

Tabla III-1. Frecuencia absoluta de machos exitosos y no exitosos

	Exitosos	No Exitosos
Irradiados	15	25
No Irradiados	25	15

Tabla III-2. Porcentaje de tiempo usado para cada actividad y resultados test de Mann-Whitney.

	Porcentaje de tiempo				Mann-Whitney			
	Irradiados		No Irradiados		Radiación		Exito	
	Exitosos	No Exitosos	Exitosos	No Exitosos	Z	p	Z	p
S	2.17	6.70	0.29	1.39	3.309	**<0.001**	-1.965	**0.049**
M	4.38	11.47	1.54	3.91	4.274	**<0.001**	-3.562	**<0.001**
CS	19.88	66.97	14.23	68.51	2.295	**0.022**	-7.101	**<0.001**
CM	3.02	7.82	1.77	7.59	2.570	**0.010**	-6.141	**<0.001**
Fa	2.49	4.93	5.21	17.03	-2.454	**0.014**	-1.756	0.079
B	0.69	0.41	1.09	1.25	-3.488	**<0.001**	3.268	**0.001**
PA	1.55	1.27	0.73	0.00	0.338	0.735	6.294	**<0.001**
VA	0.71	0.01	0.04	0.24	-1.777	0.075	-0.992	0.321
C	64.98	0.26	75.05	0.00	-2.589	**0.009**	8.186	**<0.001**
Fi	0.13	0.15	0.04	0.06	2.305	**0.021**	-0.625	0.531
MJ	0.001	0.004	0.001	0.004	-0.334	0.738	-0.442	0.658

S:"stationary", M:"mobile", CS:"stationary calling", CM:"mobile calling", Fa:"fanning", B:"buzzing", PA:"peaceful attempt", VA:"violent attempt", C: "copulation", Fi:"fight", MJ:"missing jump".

Como se puede ver en las figuras III-1 y III-2 y en la tabla III-2, los machos irradiados emplean más tiempo que los no irradiados en actividades S (Fig. III-1a), M(Fig. III-1b), CS(Fig. III-1c), CM(Fig. III-1d) y Fi(Fig. III-2d) y menos tiempo que los no irradiados en Fa(Fig. III-2a), B(Fig. III-2b) y C(Fig. III-2c). Es decir que los individuos irradiados están más tiempo realizando actividades no reproductivas (S, M y Fi) y de llamado (CS y CM) y menos actividades propias del cortejo previas a la cópula (Fa y B), y la cópula propiamente dicha dentro del período de análisis. Esto no se debe a que alcancen ésta mucho más tarde que los individuos no irradiados (Fig. III-2c) sino que llegan a copular en un número significativamente menor (Fig. III-3 y Tabla III-1) dentro del plazo establecido.

También fueron comparados los valores medios del tiempo empleado en cada actividad entre machos exitosos y no exitosos, encontrándose diferencias significativas para algunas actividades (Ver tabla III-2). De acuerdo con estos resultados, los individuos no exitosos emplean más tiempo que los exitosos en actividades como S, M, CS, CM y menos en B y PA. Es decir que los no exitosos usan más tiempo para actividades no reproductivas (S y M) y de "llamado"(CS y CM), y menos en las etapas indispensables para un cortejo exitoso.

Comparando con el mismo tipo de gráficos individuos exitosos con no exitosos dentro de los grupos de irradiados y no irradiados se pudieron observar diferentes patrones entre irradiados y no irradiados a lo largo de los 30 min. de análisis (Fig. III-4 y III-5) . Actividades como S y M son mas frecuentes en irradiados que en no irradiados (tomar en cuenta las escalas de las ordenadas en los gráficos en Fig. III-4 a,b,c,d).

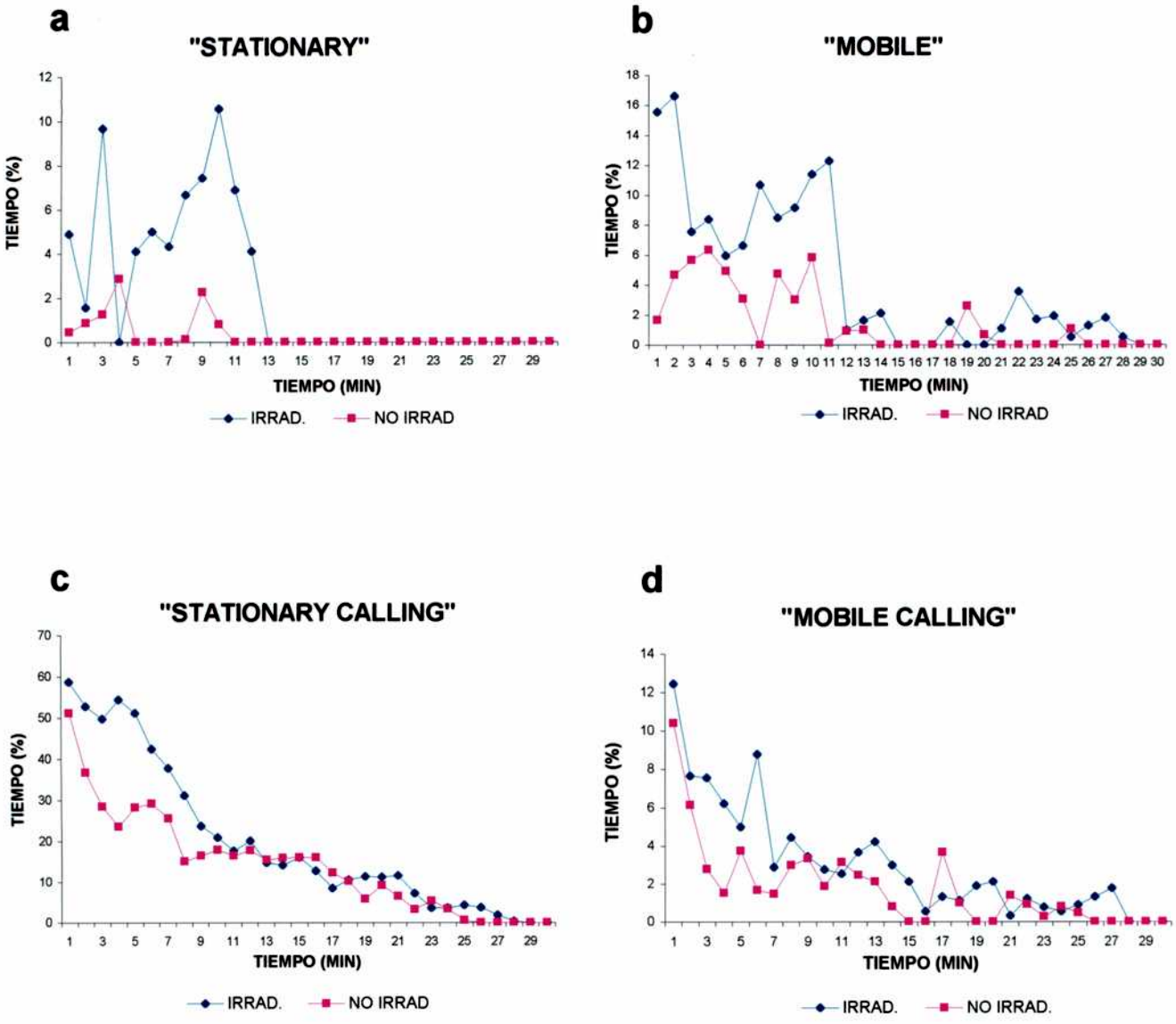


Figura III-1. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades por los individuos exitosos irradiados y no irradiados.

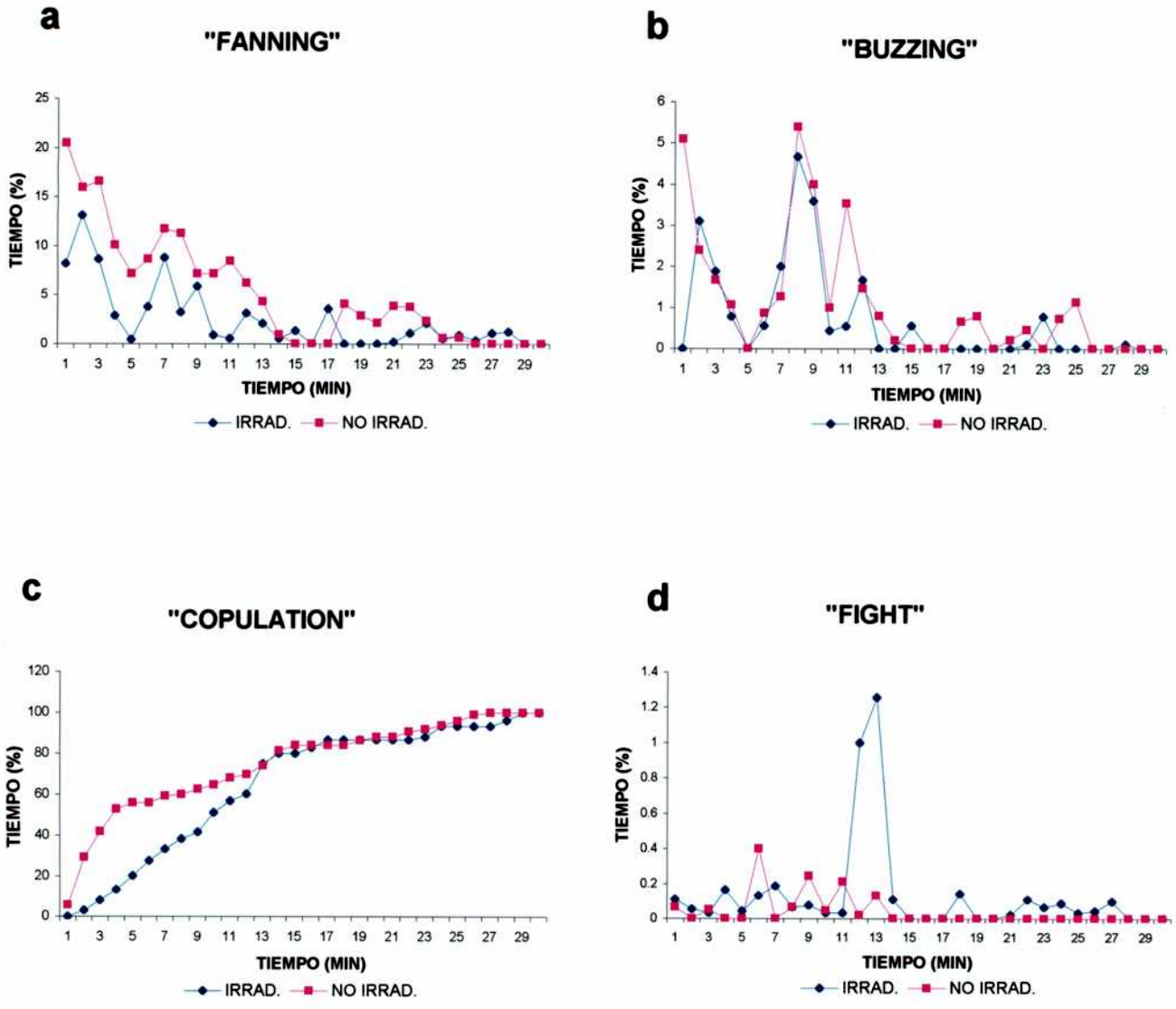


Figura III-2. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades por los individuos exitosos irradiados y no irradiados.

Además se observa que durante los primeros 10 minuto los irradiados llaman más (CS) (Fig.III-4 e,f). Las diferencias con respecto a "B" entre irradiados y no irradiados se observan sólo entre los no exitosos de ambos grupos (Fig. III-5c,d). Los irradiados prácticamente no muestran esta actividad durante los primeros 10 minutos (Fig. III-5c), mientras que en los no irradiados es similar entre exitosos y no exitosos (Fig. III-5d). En la figura III-5e, f se observa que los individuos no exitosos irradiados realizan intentos pacíficos de apareamiento mientras que los no irradiados no.

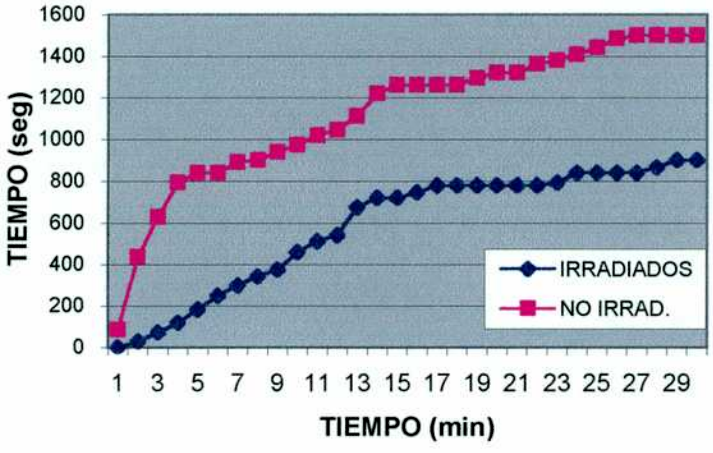


Figura III-3. Comparación del tiempo total en seg. empleado en la cópula por machos irradiados y no irradiados.

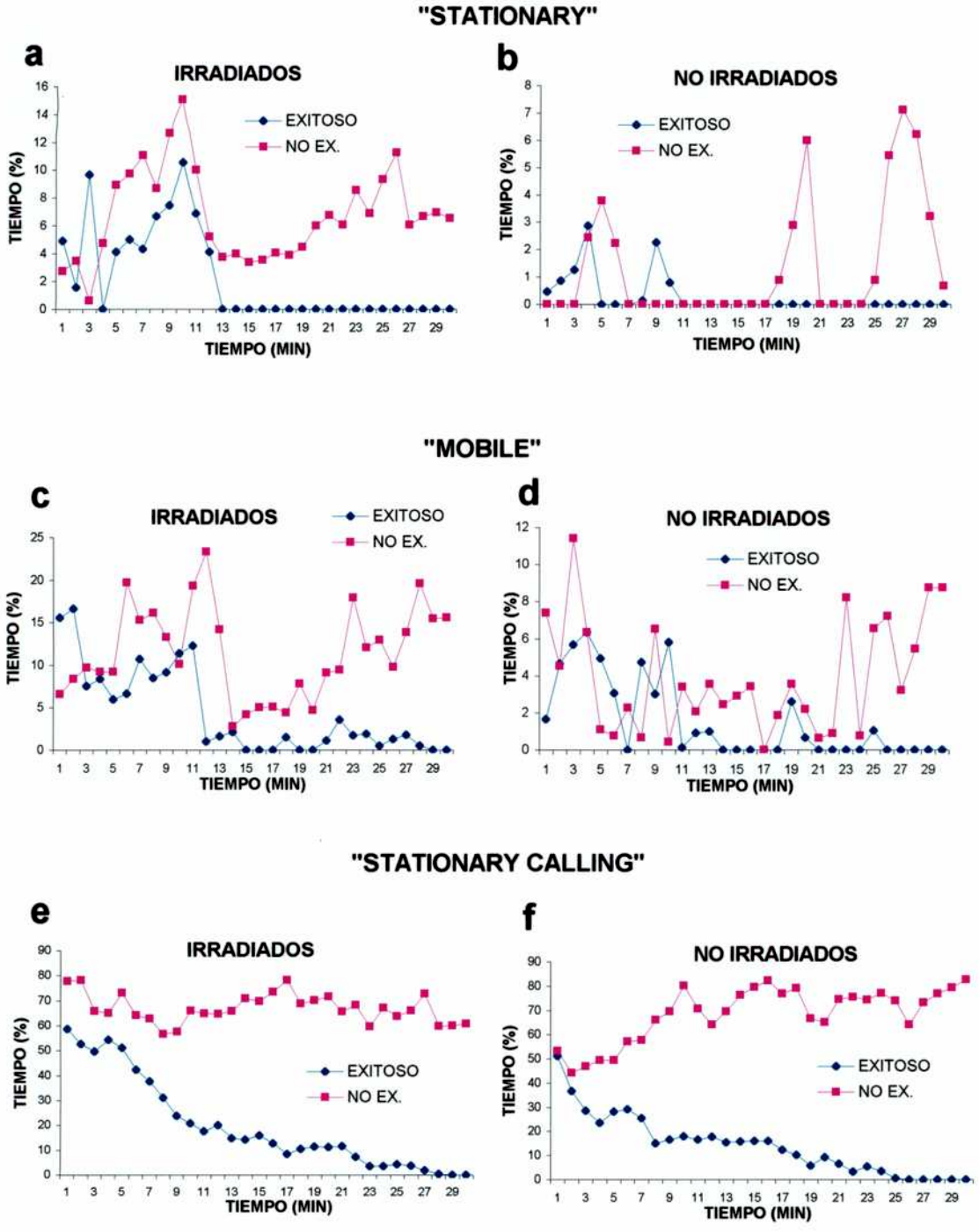


Figura III-4. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades entre los individuos exitosos y no exitosos de los grupos de irradiados y no irradiados.

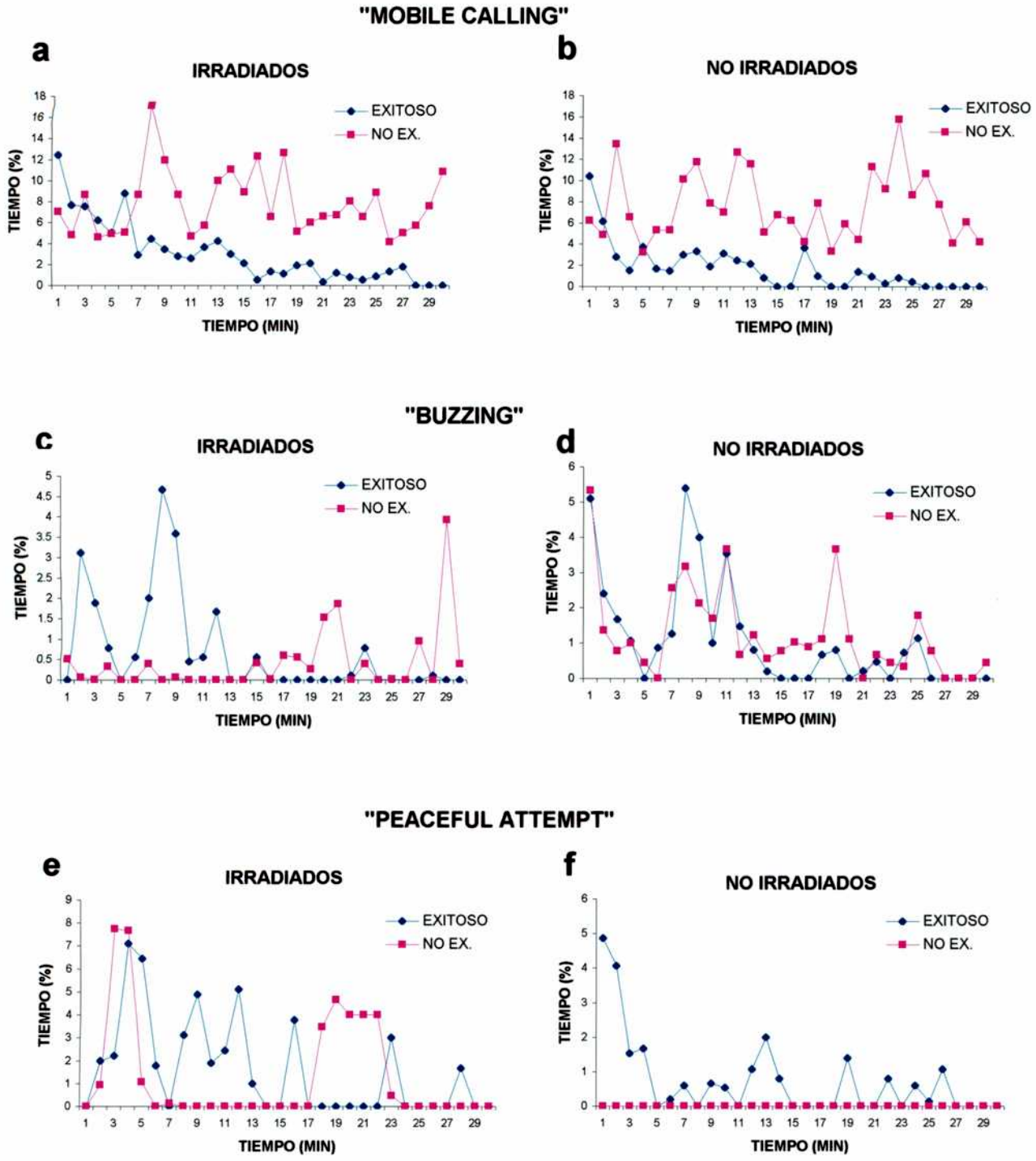


Figura III-5. Comparación del tiempo empleado para diferentes actividades entre los individuos exitosos y no exitosos de los grupos de irradiados y no irradiados.

3.3.2 Experimentos en jaula de campo

3.3.2.1 Rayos X

3.3.2.1.1 *Porcentaje de apareamiento*

Los resultados del número de machos apareados de cada grupo se indican en la tabla III-3. En la misma se observa una tendencia hacia la reducción en la eficacia a medida que aumenta la dosis de radiación recibida por el macho.

La relación entre la dosis de radiación recibida y el número de apareamientos fue analizada por medio de una prueba de Chi cuadrado de homogeneidad (Tabla III-3).

El resultado indica que la proporción de machos exitosos difiere significativamente entre los grupos. Particionando el análisis se puede demostrar que los grupos de 14000 y 7000 rad difieren entre sí y con respecto al resto. Los grupos de 0 y 3500rad no difieren entre sí.

Tabla III-3. Número de apareamientos observados para cada grupo.

Dosis de radiación (rad)	N° de apareamientos y (%)		
0	71	(41)	(a)[1]
3500	69	(40)	(a) $\chi^2 = 0.04$, $p = 0.841$
7000	29	(16)	(b) $\chi^2 = 26$, $p < 0.0001$
14000	5	(3)	(c) $\chi^2 = 87$, $p < 0.0001$

[1]: Igual letra indica que no hay diferencias significativas entre grupos

3.3.2.1.2 Distribución espacial de los apareamientos

Se registró el lugar donde se encontraron las parejas censadas, ya que las mismas podían hallarse en el árbol o en la red de la jaula. Los resultados se ven en la tabla III-4 y figura III-6.

Comparando el número de apareamientos observados en el árbol y la red para cada grupo por medio de una prueba de Chi cuadrado se obtuvieron diferencias significativas en la ubicación de las parejas según la dosis. La causa de esta diferencia es que los individuos que recibieron 14000rad se encuentran con mayor frecuencia en la red que los otros grupos. En la figura III-6 se puede observar que a medida que aumenta la dosis de radiación recibida por el macho aumenta el porcentaje de apareamientos en la red de la jaula.

Tabla III-4. Numero de parejas encontradas en la red y en el árbol de la jaula.

Dosis	Red	Arbol	
0	18	53	(a)[1]
3500	22	47	(a)
7000	13	16	(a) χ^2= 3.64, p = 0.16
14000	4	1	(b) χ^2= 8.78, p = 0.032

[1]: Igual letra indica que no hay diferencias significativas entre grupos

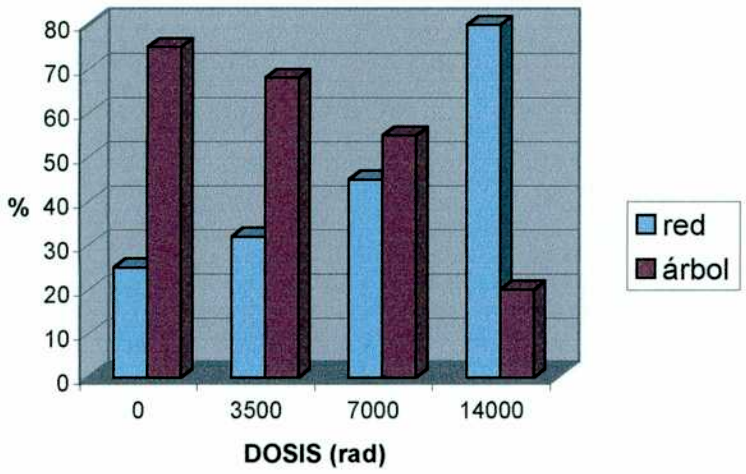


Figura III-6. Porcentaje de cópulas registradas en la red o en el árbol según la dosis de irradiación del macho

Aunque no se cuantificó la integración de los machos a los leks en función de la radiación, durante la experiencia se observó que la mayor parte de los machos irradiados con una dosis de 14000 rad permanecieron en el piso de la jaula y muy pocos se veían en el árbol formando leks.

3.3.2.1.2 *Distribución temporal de los apareamientos*

La mayor proporción de apareamientos se produjo entre las 9:00 y las 11:00 horas. En el primer registro (10 hs) se obtuvo el mayor número de cópulas (Fig.III-7).

Se pudo observar que los machos formaban grupos o "leks" y luego de la llegada de la hembra, el macho realiza un despliegue de señales acústicas y visuales ("Fanning", "Buzzing") (Fig. III-8).

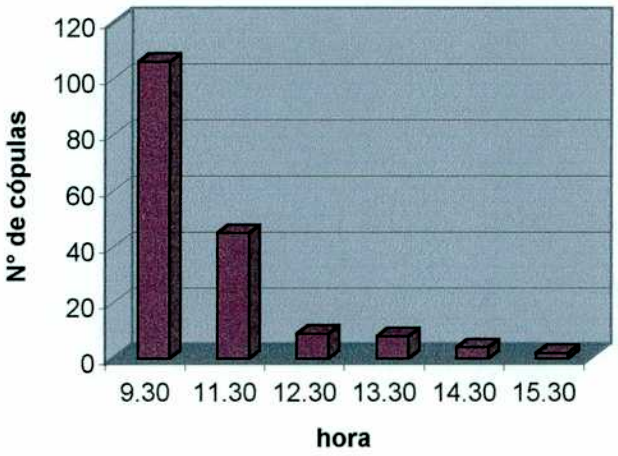


Figura III-7. Distribución de las cópulas a lo largo del tiempo del experimento.

Se observó a los machos irradiados con 14000 rad llamando en el árbol en un número mayor en horas de la tarde, cuando los machos que recibieron menor dosis de radiación dejaron de llamar. Este comportamiento anómalo de los machos irradiados con 14000 rad se observó reiteradamente durante las repeticiones de la experiencia en jaula de campo.

3.3.2.2 Rayos gamma

3.3.2.2.1 Porcentaje de apareamiento

El número de machos apareados de cada grupo se indica en la tabla III-5. Se observa una tendencia hacia la reducción en la eficacia a medida que aumenta la dosis de radiación. La relación entre la dosis de radiación recibida y el número de apareamientos fue analizada por medio de una prueba Chi cuadrado de homogeneidad. El resultado indica que la proporción de machos exitosos difiere significativamente entre los grupos (χ^2= 36.5, P< 0.001) . Particionando el análisis se puede demostrar que los grupos de

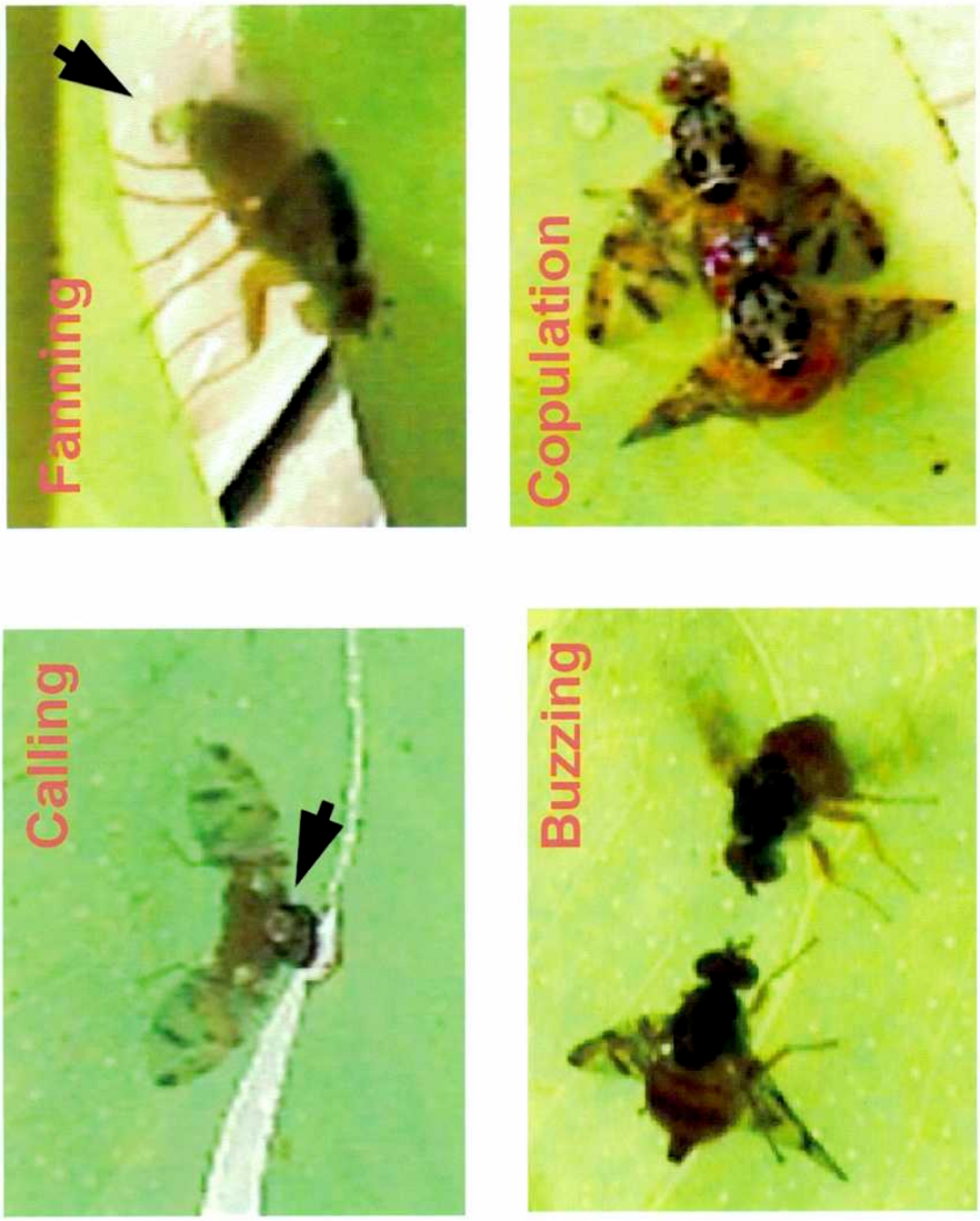


Figura III-8. Etapas del cortejo, registradas en el árbol de la jaula de campo

140 y 100 Gy difieren entre sí (χ^2= 8.2, p= 0.004) y con respecto al resto (excepto los grupos 100 y 70 χ^2= 3.2, *P*= 0.07). Los grupos de 0 y 70 Gy no difieren entre sí (χ^2= *1.4, P= 0.23*).

Tabla III-5. Número de apareamiento observado para cada grupo

Dosis de radiación (Gy)	N° de apareamientos y (%)
0	136 (33%)
70	120 (29%)
100	97 (23%)
140	64 (15%)

3.3.2.2.2 Tiempo de cópula

El tiempo de cópula promedio (en minutos) para los machos no irradiados e irradiados con 70, 100 y 140 Gy fue de 169, 170, 155 y 148 respectivamente (Fig.III-9). Al comparar estos valores mediante un análisis de varianza se obtuvo un resultado significativo (*F*= 5.4; *P*=0.001), debido fundamentalmente a la diferencia entre 140 Gy y no irradiados e irradiados con 70 Gy (*P*= 0.021 y 0.015 respectivamente). Los restantes contrastes de Scheffé no fueron significativos.

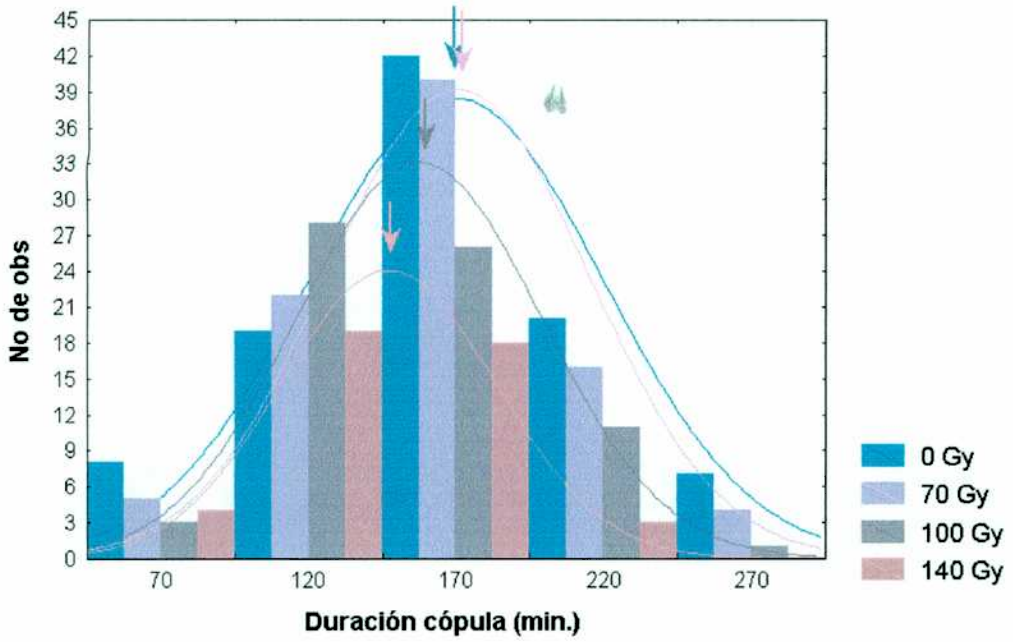


Figura III-9. Distribución del tiempo de cópula para los diferentes grupos

3.3.2.2.3 *Distribución espacial y temporal de los apareamientos*

Se analizó, por medio de una prueba Chi cuadrado, si existían diferencias entre los grupos en cuanto a la distribución de las cópulas en distintos lugares de la jaula (Tabla III-6). Al considerar distintas partes anatómicas del árbol (cara adaxial o abaxial de la hoja, tronco, red) no se encontraron diferencias significativas entre grupos (χ^2= 15.0, P= 0.08). En todos los casos la mayor proporción de parejas se formó en la cara abaxial de la hoja.

Tabla III-6. Distribución porcentual de las cópulas en distintos órganos de la planta y red.

	0 Gy	70 Gy	100 Gy	140 Gy
Hoja adaxial	6.0	12.2	4.0	6.5
Hoja abaxial	79.8	75.6	74.7	66.1
Tronco	6.7	6.1	11.1	11.3
Red	7.5	6.1	10.1	16.1

Si bien no se encontraron diferencias significativas entre grupos con respecto a la altura del árbol en la cual fue censada la pareja (χ^2= 15.4, *P*= 0.08), como puede verse en la tabla III-7 en los grupos 0 y 70Gy las parejas se encontraron mayoritariamente en el tercio medio, mientras que en los irradiados con dosis mayores el mayor número de parejas se encontró en el tercio inferior.

Tabla III-7: Porcentajes de cópulas a diferentes alturas de la planta.

	0 Gy	70 Gy	100 Gy	140 Gy
Tercio superior	17.2	18.1	16.0	9.5
Tercio medio	49.2	44.8	35.0	36.5
Tercio inferior	26.1	31.0	39.0	38.1
Red	7.5	6.1	10.0	15.9

En este caso también, como en la experiencia con irradiación con rayos X, la mayor tasa de apareamiento se observó las 9:00 y las 11:00, registrándose el mayor número de cópulas a las 9:30.

Se pudo observar que los machos formaban grupos o "leks". Esta señal atrae a la hembra a la zona del "lek". Se vio que el numero de machos por lek era de 3 a 6 y éstos se forman en general en la parte central de la copa del árbol. La ubicación de los leks dentro de la copa del árbol va variando a lo largo del día, pero siempre se mantienen en la parte central del árbol.

Al igual que en el caso de la radiación con rayos X se observó que algunos de los machos irradiados con altas dosis, 140Gy y 100Gy, permanecieron en el piso de la jaula en vez de estar en el árbol formando leks. Estas observaciones no se cuantificaron pero se observó en todas las repeticiones de la experiencia.

3.3.2.2.4 Análisis de esterilidad

El número de huevos eclosionados de las hembras apareadas con los diferentes grupos de machos se muestra en la tabla III-8. Se analizó, por medio de una prueba Chi cuadrado de homogeneidad, si existían diferencias entre los grupos en cuanto al número de huevos eclosionados. El resultado indica que existen diferencias significativas entre los grupos ($P< 0.001$). La principal causa de estas diferencias es que para los grupos de 140 y 100 Gy no se encontraron huevos eclosionados. Además los grupos de 0 y 70 Gy difieren entre sí.

Tabla III-8. Número (y porcentaje) de huevos eclosionados y no eclosionados de las hembras apareadas con los distintos grupos de machos

Dosis de radiación (Gy)	Eclosionados	No eclosionados	Totales
0	2844 (89%)	350 (11%)	3194
70	97 (4.5%)	2076 (95.5%)	2173
100	0 (0%)	2793 (100%)	2793
140	0 (0%)	1954 (100%)	1954

3.4 DISCUSION

3.4.1 Experiencia de videograbación con material irradiado

En esta parte del trabajo se pudo determinar que las altas dosis de radiación producen una disminución significativa en el éxito copulatorio que no puede adjudicarse a la competición entre machos, ya que éstos se enfrentaban solos con una hembra. La proporción de cópulas en individuos irradiados es menor que en los no irradiados pero la diferencia, si bien significativa, no es tan pronunciada como en la jaula, donde existía competencia intrasexual. La variabilidad en el éxito copulatorio puede deberse tanto a diferencias en la actividad del macho previa a la llegada de la hembra, como en la actividad en presencia de la hembra y a la elección que ella podría realizar (Whittier et al. 1994).

Parte de esto se evidenció al analizar las diferentes actividades del cortejo, cuantificando los tiempos empleados por el macho para cada una de ellas. Se pudo

establecer que los machos irradiados emplean menos tiempo en actividades esenciales para un cortejo exitoso. Se pudo demostrar que estos machos al acercarse la hembra realizan menos vibraciones de alas (Fa) y aleteos intermitentes (B), lo que podría ser la razón de su menor éxito copulatorio. La causa por la cuál las actividades se ven alteradas puede deberse a propiedades exclusivas del macho o a que la hembra responda de diferente manera a las señales del macho quizás como consecuencia de alteraciones en la composición de la feromona, o en los sonidos emitidos por el macho irradiado.

Con el análisis de las videograbaciones se determinó que las altas radiaciones afectan el comportamiento en el apareamiento. Si bien en los individuos irradiados estuvieron presentes todas las actividades del cortejo, se observaron diferencias en los tiempos dedicados a cada actividad en comparación con los no irradiados. En particular, en los individuos irradiados se reduce el tiempo dedicado a actividades esenciales del cortejo previas a la cópula (selección intersexual).

Liimatainen et al. (1997) en informaron que no encuentran mayores diferencias comportamentales entre machos de cría masiva irradiados y no irradiados: la ocurrencia del cortejo y la frecuencia de cópula fue similar entre estos grupos. Si bien la dosis de rayos gamma que utilizaron fue alta (15 Krad), la baja tasa de apareamiento para ambos grupos puede ser la causa por la cual no encontraron diferencias en el éxito en el apareamiento. Tampoco ellos realizaron un análisis detallado de la comparación de los tiempos de las etapas del cortejo entre irradiados y no irradiados donde hubo diferencias. Sin embargo, Lux et al. (1999) demostraron que las altas dosis de radiación reducen marcadamente el éxito en el apareamiento, en moscas de cría masiva de México, Australia y Argentina.

3.4.2 Experiencias en jaulas de campo con material irradiado

Los resultados obtenidos en este experimento revelan que el éxito copulatorio en los machos de *Ceratitis capitata* se ve afectado según la dosis de radiación recibida. Esta disminución en el éxito copulatorio podría reducir sensiblemente la eficiencia de la técnica del insecto estéril. El poco éxito de los individuos que recibieron altas dosis se debe a que la misma afecta distintas funciones del organismo incluso la producción de feromonas (Heath et al. 1994), factor esencial para los machos en el logro del apareamiento. Las feromonas no sólo permiten al macho atraer a las hembras, sino que intervienen en la formación del lek y en la atracción de nuevos machos al mismo (Burk1991). La percepción de los individuos que recibieron altas dosis podría verse reducida, de manera tal que no estarían en condiciones de guiarse al área de lek.

Una de las observaciones importantes que se realizaron en esta experiencia consiste en que los machos que recibieron altas dosis de rayos X (14000 rad) no formaban leks o su ocurrencia era muy pobre. Además se los veía con poca actividad en el piso de la jaula en gran número. Una de las causas de este comportamiento anómalo puede ser que su capacidad de vuelo se haya visto afectada por la radiación. También se observó que algunos de estos machos "llamaban" en el árbol en horas de la tarde cuando los individuos menos irradiados ya no estaban allí. Esto puede deberse a que son incapaces de competir con los machos activos, o bien que se afecte su ritmo circadiano reduciendo su posibilidad de encuentro con las hembras. En cambio, en el caso de la irradiación gamma los machos de todos los grupos formaban leks estableciendo su territorio en la cara abaxial de hojas vecinas. El número de machos por lek (3 a 6) coincide con experiencias en jaulas de campo en Guatemala (Prokopy and Hendrichs 1979). También

se observó que estos leks estaban ubicados en el centro de la copa del árbol cítrico, lo que coincide con los resultados de la ubicación de las cópulas, ya que la mayor parte de ellas se dieron en el tercio medio del árbol. Los machos con altas dosis de radiación gamma se aparearon más en el tercio inferior del árbol. Esto puede deberse a que sean rechazados de los leks que se forman en la parte central de la copa de los árboles. Además algunos de los machos irradiados con altas dosis mostraban poca actividad, permaneciendo en el piso de la jaula. La menor actividad de los machos irradiados puede asociarse con menor capacidad para convertir alimentos. La participación en los leks es nutricionalmente cara y Walburg y Yuval (1997b), encontraron que los machos que participan de los leks tienen más proteínas y azúcar en sus cuerpos.

Se puede concluir que el ritmo circadiano de los grupos de machos estudiados tratados con rayos gamma no está alterado comparándolos con sus pares no irradiados. Esto parece indicar que a altas dosis los rayos gamma no son tan nocivos como los rayos X. A dosis equivalentes (14000 rad y 140 Gy), con rayos X los machos tenían alterado su ritmo circadiano, llamaban más durante horas de la tarde (cuando los otros dejaban de hacerlo), su habilidad de vuelo se observó más alterada aún, y la proporción de machos exitoso fue muy baja en comparación con los rayos gamma.

Por otro lado, los machos irradiados con bajas dosis de rayos X (3500 rad) copularon en igual proporción que los no irradiados. La habilidad competitiva de estos machos parece ser semejante a la de los machos no irradiados. Experiencias de competitividad entre machos irradiados a diferentes dosis y no irradiados (Favret et al. 1995) sugieren que las dosis cercanas a 3500 rad son más eficientes pues con ellos se obtiene el menor número de huevos eclosionados. El uso de bajas dosis de radiación asegura una buena aptitud

copulatoria de los machos, aunque no la esterilidad total. A su vez, el uso de altas dosis logran la esterilidad total pero no una buena aptitud copulatoria.

La duración de la cópula fue significativamente menor en los machos irradiados con 140 Gy que en los no irradiados o irradiados con 70 Gy. Esta diferencia podría afectar la transferencia de esperma puesto que se vio que tiempos de cópula muy cortos (menos de 15 min.) no producen transferencia de esperma (Seo et al. 1990). Contrariamente a lo esperado, varios estudios apuntan a que con tiempos de cópula normales puede producirse ausencia de transferencia de esperma (Camacho 1989; Seo et al. 1990). Debe tenerse en cuenta que no basta que los machos estériles liberados sean capaces de aparearse con las hembras salvajes, sino que además deben ser capaces de transferirle su esperma. Si esto no ocurre, en la naturaleza las hembras tenderían a copular con otros machos que sean capaces de transferir esperma. En el capítulo IV se analizan las espermatecas de las hembras apareadas para determinar si hay diferencias en la transferencia de esperma entre los grupos y por ende en la habilidad competitiva de los machos apareados.

Como pudo verse con el análisis complementario de número de huevos eclosionados, el uso de dosis relativamente bajas de radiación gamma (70 Gy) asegura una buena aptitud copulatoria de los machos aunque no la esterilidad total. A su vez, el uso de altas dosis logran la esterilidad total pero no una buena aptitud copulatoria.

Aunque los resultados obtenidos en este experimento revelan que el éxito copulatorio en los machos disminuye por efecto de la radiación recibida esto se podría compensar, para no reducir la eficiencia de los programas de control y erradicación de esta plaga, porque la cantidad de machos estériles liberados es 100 veces mayor que el número estimado de la población natural. Además, con el manejo integrado se trata de reducir el tamaño

poblacional de la plaga previamente a la aplicación de la TIE, por ejemplo por medio de trampeo. Por lo tanto los machos liberados se encuentran con un número bajo de *competidores* salvajes.

Con el aumento del uso de las líneas de sexado genético unisexuales en la TIE se debería realizar una reevaluación estratégica de la esterilización de los machos *utilizados* para liberar. El tratamiento con menores dosis de radiación redundaría en una mayor eficiencia de los machos por el apareamiento o sea que se podría liberar un menor número de insectos más competitivos, lo que bajaría los costos de producción. Además, la liberación de algún macho fértil no es tan perjudicial como liberar hembras portadoras de huevos fértiles.

Otro tema a unificar para incrementar la eficiencia de la TIE es la dosis real que reciben las pupas en el irradiador, porque según el volumen que se irradie o la estructura del irradiador llegan distintas intensidades a diferentes puntos. A esto hay que agregar que las fuentes de irradiación decaen con el tiempo y probablemente no produzca el mismo efecto una dosis aplicada en un período de tiempo mayor.

A nivel mundial se intenta reducir la dosis de radiación, siempre logrando un compromiso entre la máxima esterilidad y machos exitosos en el apareamiento con las hembras del campo.

Análisis del desempeño en el apareamiento de una línea de sexado genético: en jaulas de campo y videograbaciones

4.1 INTRODUCCION

4.1.1 Una nueva línea de sexado genético

Para aumentar la efectividad de la TIE es muy aconsejable eliminar la producción de hembras. Esto además redunda en una apreciable reducción de los costos, ya que se liberan millones de insectos, la mitad de los cuales son hembras (Favret et al. 1995). Para ello se están desarrollando líneas de moscas que admiten una separación selectiva de los sexos. Los sistemas más eficientes implican un sistema de letal condicionado (mecanismo autocida) del sexo no deseado (hembras). Lo ideal es que este proceso ocurra en un estado muy temprano del desarrollo, por ejemplo en las larvas, para que represente un ahorro importante en el costo de producción. En nuestro país se desarrollaron líneas de sexado genético (LSG) en las cuales los machos y las hembras se reconocen en un estadio avanzado del desarrollo larval por el color de los espiráculos posteriores, por el color diferente de las pupas o por diferente tamaño de estas últimas (Favret et al. 1995). Estas líneas presentas rasgos que permiten una separación mecánica del sexo, pero no traen aparejada una reducción de los costos de cultivo. Por esta razón se aisló, en el Instituto de Genética/CICA/INTA Castelar, una nueva mutante que causa cambios visibles en la iridiscencia del ojo y una pigmentación más rojiza que la salvaje (Manso y Lifschitz 1992; Cladera 1995). Este gen afecta además la tasa de desarrollo

produciendo un desarrollo embrionario más lento que el salvaje *sw*. Mientras que el 90% de los huevos de fenotipo salvaje eclosionan a las 36hs de incubación, los mutantes no completan su desarrollo sino hasta después de 76 hs. Por una traslocación cromosómica se logró asociar el cromosoma 2 que lleva el alelo salvaje para la mutación, con el cromosoma Y, obteniéndose una línea en la cual los machos son heterocigotas y tienen un desarrollo embrionario normal y las hembras son homocigotas con fenotipo mutante (Cladera 1995). De esta manera es posible separar machos de hembras en una etapa temprana del desarrollo.

Aunque la TIE se está implementando ampliamente, presenta distintos problemas metodológicos que han llevado a la necesidad de profundizar diversos aspectos de la biología de esta especie. Estas LSG, una vez obtenidas deben adaptarse a la cría masiva. En este proceso es importante evaluar la estabilidad de la translocación. Por otra parte es necesario analizar diferentes características que determinan su utilidad para la TIE, tales como el comportamiento durante el cortejo, selección sexual y sistema de apareamiento y comprobar que no hubo efectos adversos debido a la manipulación genética.

Un mejor conocimiento del comportamiento de los insectos a controlar y mejor entendimiento de los factores que afectan la selección sexual perfeccionará la eficiencia de la TIE.

4.1.2 Características de los leks

El sistema de apareamiento de *C. capitata* es el lek (ver introducción). Una táctica de apareamiento alternativa empleada por algunos machos de la población es custodiar

frutas (Prokopy y Hendrichs 1979, Warburg y Yuval 1997a). Los machos se agregan en leks durante la mañana tardía y la tarde temprana en la copa de los árboles hospederos y defienden hojas individuales como sus territorios de apareamiento (Prokopy y Hendrichs 1979). Desde estas hojas los machos producen un conjunto de señales olfativas, auditivas y visuales que atraen a las hembras (u otros machos) al área del lek (Shelly y Whittier 1997).

Durante el período de "lekking" diario, no todos los machos de la población participan en leks. En un estudio realizado por Yuval et al. (1998), se midieron el tamaño y el peso de los machos capturados en leks y fuera de éstos. Además se cuantificó la cantidad de azúcar, lípidos y proteínas en cada individuo. No se encontraron diferencias en el tamaño entre machos ubicados en leks o en la vecindad de los mismos. Sin embargo, los machos de los leks fueron significativamente más pesados y contenían más proteínas y azúcares que el resto de los machos. Aparentemente, solamente los machos con adecuadas reservas nutricionales pueden formar leks.

Field et al. (1999), consideran para los leks la existencia de dos escalas de distribución, una es entre árboles o grupos de árboles dentro de un dado hábitat y la otra son pequeñas áreas (aproximadamente 30 cm) dentro de la copa de un dado árbol.

El cuestionamiento del sitio seleccionado para el lek en el campo fue tratado en varios estudios. Los machos son muy selectivos en la elección del lugar del lek y la ubicación de los leks es muy estable a través del tiempo. Por ejemplo Whittier et al. (1992), realizaron un censo sistemático de 118 árboles en un huerto en Hawai, 10 de estos árboles acumulaban el 80% de los sitios de leks, mientras que 79 árboles tenían ausencia de sitios. Como un resultado de la selección de los machos, los leks y sus productos, las cópulas, ocurren sólo en un subgrupo de los árboles disponibles. Hay

poca información sobre la característica de estos árboles. En un solo estudio de este tipo, Shelly y Whittier (1995) asociaron la distribución entre árboles individuales de una sola especie (níspero, *Diospyros kaki* L.) con varias características físicas y posiciones de los árboles. Utilizaron una regresión múltiple, con el número de leks como variable dependiente y ancho del árbol, volumen, densidad del follaje, distancia media a los dos vecinos más cercanos y el número de leks total en los dos árboles más cercanos como variables independientes. Los leks no estaban distribuidos aleatoriamente entre los árboles, lo que se evidenció principalmente por el gran número de árboles que no contienen leks. También se estableció la ubicación de los leks durante los 60 días del período de estudio. El análisis de regresión identificó sólo dos variables asociadas con la distribución de los leks: volumen del árbol y número de leks totales en los dos árboles más cercanos. Los leks fueron raramente encontrados en árboles pequeños, pero estuvieron igualmente distribuidos entre árboles medianos y grandes. Los leks estaban agrupados en el espacio, esto deriva principalmente del hecho que los cinco árboles más frecuentemente utilizados estaban agregados.

Una vez que un árbol es elegido, los factores que influyen en el sitio dentro del mismo pueden ser abióticos (temperatura, humedad relativa, intensidad de luz) (Prokopy y Hendrichs 1979) y bióticos, tales como evitar la depredación (Hendrichs et al. 1994, Hendrichs y Hendrichs 1990), la proximidad de recursos nutricionales, sitios de oviposición, la presencia de otros machos, y tamaño e integridad de la hoja (Kaspi y Yuval 1999a. El peso relativo de cada factor puede ser reflejado por la ubicación tridimensional de un macho dentro de la copa, la cual puede proveer protección a predadores (Hendrichs y Hendrichs 1990, Hendrichs et al. 1994), viento, luz solar directa y pérdida de agua (Prokopy y Hendrichs 1979, Arita y Kaneshiro 1989),

mientras que suministra una efectiva plataforma desde la cual el macho emite señales de cortejo (Kaspi y Yuval 1999b).

La táctica alternativa de apareamiento de custodiar fruta parece ser poco frecuente y aparece luego de que la actividad de lek a cesado (Prokopy y Hendrichs 79, Warburg y Yuval 1997a). Los machos que emplean esta táctica establecen su territorio en un fruto hospedero y acosan a las hembras que arriban para ovipositar. No está claro qué machos en la población eligen emplear esta táctica, si algunos machos sólo están en los frutos o si los machos que no tuvieron éxito en el apareamiento en los leks, proceden a establecer su territorio en una fruta en un intento de cumplir su potencial reproductivo.

4.1.3 Cópula, inseminación y fertilización

Para efectivizar su potencial reproductor, los machos de insectos deben pasar tres obstáculos que son de cierto modo controlados por las hembras. Ellos son copulación, inseminación y fertilización. Para ganar cópulas los machos deben siempre competir con machos rivales para acceder a las hembras, o cortejar hembras efectivamente (Thornhill y Alcock 1983). Inseminación y fertilización no siguen inevitablemente a la cópula, porque estos son determinados por una serie de interacciones complejas entre los sexos que, frecuentemente, tienen intereses reproductivos encontrados. Es importante distinguir entre estos eventos porque competición de esperma y mecanismos postcopulatorios regulados por la hembra (Eberhard 1991) pueden actuar luego de la cópula e inseminación y afectar la aptitud efectiva del macho (Alcock 1994).

En general la secuencia reproductiva de tefrítidos contiene los siguientes elementos: llamado del macho y cortejo, copulación, inseminación, fertilización y oviposición

(Sivinski y Burk 1989). En la mayoría de las especies estudiadas las hembras son receptivas a múltiples machos y pueden aparearse varias veces en la vida (Whittier y Shelly 1993). El esperma es depositado en órganos especializados, las espermatecas, donde presumiblemente los espermatozoides son nutridos y movilizados cuando se necesitan para la fertilización.

Estudios de laboratorio sugieren que la duración de la cópula esta positivamente asociada con la cantidad de esperma almacenado por la hembra (Farrias et al. 1972; Seo et al. 1990). Estudios de *C. capitata* en la naturaleza han mostrado también una notable disparidad en la duración de la cópula. Wong et al. (1984) y Whittier et al. (1992) observaron copulaciones en leks naturales en Hawai y encontraron duraciones de cópulas en promedio de 144 y 179 minutos respectivamente. La duración de la cópula es dependiente de la línea de laboratorio y de la asimetría en tamaño de la pareja apareada. Moscas de ciertas líneas de laboratorio copulan por más tiempo que moscas de otras líneas, y parejas en las cuales los machos eran más pequeñas que las hembras copulaban por más tiempo que las parejas en las cuales sus integrantes eran semejantes en tamaño (Field et al. en prensa). El tamaño absoluto de la hembra también tiene un efecto significativo sobre la duración, aunque menor que el tamaño relativo, mientras que no se detectó ningún efecto del tamaño absoluto del macho.

El nivel nutricional del adulto también afecta la duración de la cópula (Field y Yuval 1999). Cuando machos y hembras fueron alimentados con proteínas o privados de ella, el efecto de la nutrición de las hembras sobre la duración de la cópula fue más marcado que en los machos. Esto sugiere que las hembras realizan un control substancial sobre la cópula. Cuando ambos fueron privados de proteínas la duración de la cópula fue prolongada para el primer apareamiento y el reapareamiento al día siguiente. El interés

de machos privados de proteína podría ser por apareamientos más largos dado su menor habilidad de obtener futuros apareamientos. El beneficio de las hembras es menos obvio y podría ser su menor habilidad para forzar al macho a separarse. Otra posibilidad es que la hembra obtenga un beneficio nutricional del macho en cuyo caso cópulas largas podrían representar un interés de ambos.

Hay una correlación negativa entre la duración del apareamiento inicial y la proporción de hembras que aparean una segunda vez en C. capitata (Saul et al. 1988). Aparentemente la receptividad de la hembra al reapareamiento está correlacionada con el volumen de esperma en la espermateca (Nakagawa et al. 1971).

Varios aspectos de la transferencia de esperma han sido estudiados (McInnis 1993). Farrias et al. (1972) determinaron cualitativamente que el esperma se acumula en la espermateca durante la cópula. Seo et al. (1990) encontraron que luego de dos horas de cópula el 94% del esperma estaba en la espermateca y el resto en otras áreas del tracto reproductivo. Gage(1991) mostró que el riesgo de competencia de esperma afecta la cantidad de esperma con que el macho insemina la hembra. Machos apareados en presencia de un macho potencialmente rival, eyaculan significativamente más esperma que machos aislados. Yuval et al. (1996) determinaron que los testículos de los machos contenían en promedio 34.000 células espermáticas antes de la cópula y aproximadamente 14.000 luego de la cópula. La mayoría de este eyaculado no llega a la espermateca. La espermateca de una hembra de laboratorio apareada una vez contiene 3212 espermas en promedio, cantidad similar a la que se encontró en hembras colectadas del campo. La localización del esperma entre las espermatecas, en hembras del laboratorio y del campo, es significativamente no aleatoria: un órgano, el derecho o

el izquierdo, contiene significativamente más esperma. Esto sugiere que la ubicación del esperma es controlada por el macho o por la hembra (Taylor y Yuval 1999).

El esperma no es la única sustancia transferida por el macho a la hembra. Parte del eyaculado consiste de secreciones de las glándulas accesorias del macho (MAGS). No se ha podido determinar la función precisa de MAGS en tefrítidos. Sin embargo ciertos patrones de comportamiento de la hembra (Jang 1995, Jang et al. 1998) son modulados por la cópula o por inyecciones de mags: las hembras tratadas eluden los machos y buscan sitios de oviposición.

4.1.4 Interacción macho-macho.

Un macho montando otro macho como en un intento de cópula, que puede durar varios minutos, es un comportamiento común observado en tefrítidos (Perdomo 1976; Prokopy y Hendrichs 1979). Esto puede ser interpretado de distintas formas: como la existencia de un límite bajo para el inicio de la excitación sexual, que los machos no pueden distinguir el sexo del individuo que llega antes del contacto táctil o podría ser que los machos adopten comportamientos que imitan hembras intrusas para intentar desalojar a los residentes de sus territorios.

En condiciones de cría masiva, a veces otros machos adicionales pueden montar la pareja homosexual, se observaron cadenas de hasta 10 machos (Feron 1962). Los intentos de cópula entre machos se observan también en el campo. La mayoría de los autores interpretan este comportamiento como una evidencia de una baja discriminación de sexos por los machos. Iwahashi y Majimar (1986) mostraron que los machos reconocen el sexo del oponente antes de hacer contacto con él y que dicho

comportamiento entre machos podría ser una forma de agresión entre machos más que un error.

Los machos interaccionan entre ellos con comportamientos agresivos para defender su territorio. Embisten y empujan o dan "latigazos" con sus alas contra los intrusos o más pasivamente chocan sus cabezas, manteniéndolas unidas hasta algunos minutos (Arita y Kaneshiro 1989).

El presente trabajo fue realizado con la intención de incrementar los conocimientos de la aptitud copulatoria de la LSG (T228) de *C. capitata*, basada en la mutación *sw*. Se puso especial énfasis en el comportamiento durante el cortejo y la compatibilidad de esta línea con moscas salvajes.

Por un lado en jaulas de campo se cuantificó el éxito en el apareamiento y tiempo de cópula para la línea T228 irradiada y no irradiada, comparada con una línea de fenotipo salvaje sin irradiar. Además se midió si hubo o no transferencia de esperma en las hembras apareadas durante este experimento.

Por otra parte en condiciones óptimas simuladas en laboratorio, se analizaron en pequeñas cajas por la técnica de videograbación cortejos exitosos y no exitosos. Se compararon moscas de una población salvaje y la línea T228, cuantificando las diferencias entre ellas mediante pruebas unisexuales (dos tipos de machos con un tipo de hembra) y bisexuales (machos y hembras de ambos tipos simultáneamente).

4.2 MATERIAL Y METODOS

4.2.1 Experiencia en jaulas de campo

El material biológico utilizado fue la línea de sexado genético (LSG) obtenidas por Instituto de Genética/CNIA/INTA Castelar, llamada T228. Esta línea de laboratorio es una de las que se obtuvieron en el mencionado Instituto con diferentes translocaciones y con el gen *sw*. La otra línea utilizada en este experimento es la línea Mendoza de cría masiva. La línea T228 fue obtenida por la inducción y manipulación genética de la línea Mendoza. Ambas líneas fueron criadas en el IG/CNIA/INTA Castelar hasta el estadio de pupa. El 50% de las pupas de la línea T228 fue irradiado, 48 hs. antes de la eclosión, con una fuente de emisión de rayos X, con un equipo Phillips. La dosis aplicada fue 10.000 rad.

Las pupas fueron trasladadas al Laboratorio de Genética de Poblaciones en Ciudad Universitaria, donde se colocaron en la cámara de cría. Los adultos emergidos se colocaron en número de 30 en frascos de 2750 ml, separados por sexo, línea, y tratamiento de radiación. Las hembras emergidas de la línea T228 fueron descartadas. Las moscas se envejecieron hasta la edad de 7 a 9 días en la cámara de cría, obteniéndose así individuos sexualmente maduros y de igual edad para evitar errores en la proporción de éxito copulatorio atribuibles a diferencias de maduración. Los machos de diferentes líneas fueron identificados mediante diferentes colores. Para esta experiencia se utilizaron dos jaulas de campo.

El experimento se realizó entre el 28 de febrero y 20 de marzo de 1998 y constó de 9 repeticiones para cada jaula. Las temperaturas mínima y máxima en ese período fueron

15 y 32 °C respectivamente, condiciones favorables para la cópula, según se vio en el Capítulo I.

Cada día a las 7 de la mañana se liberaron 60 machos en cada jaula, 30 de cada línea. En una de las jaulas los machos de la línea T228 estaban irradiados mientras que en la otra estaban sin irradiar. Los machos de la línea Mendoza no fueron irradiados en ningún caso. A las 8:00 hs. se liberaron 30 hembras vírgenes de la línea Mendoza en cada jaula. A partir de ese momento se ingresó a la jaula cada hora entre las 9:00 y las 16:00 hs. (8 observaciones) para extraer las parejas en cópula. Se registró el número de parejas en cópula para cada línea como así también la ubicación de la pareja en el árbol. Las parejas fueron extraídas cuidadosamente para que no se separaran y colocadas individualmente en frascos de 300ml a la sombra para contabilizar el tiempo de cópula.

Al final de cada día las hembras que copularon se conservaron en frío (-20°C) para un posterior estudio de transferencia de esperma.

Análisis estadístico

Para comparar los tiempos de cópula se utilizó una prueba ANOVA y las comparaciones de a pares se hicieron una prueba de contrastes de Scheffé

4.2.2 Análisis de transferencia de esperma

Las hembras apareadas en el experiencia anterior fueron retiradas del congelador y disecadas bajo lupa extrayéndole a cada una las dos espermatecas. Estas se montaron en un portaobjetos de a pares y se las coloreó con orceína acética. Al colocar el cubreobjetos y presionar levemente las espermatecas se rompen y se puede observar presencia o ausencia de esperma. El análisis se hizo con microscopio óptico con un aumento de 20X.

Se analizaron espermatecas de un total de 60 hembras apareadas con machos de los tres grupos, T228 sin irradiar, T228 irradiados y Mendoza, eligiendo al azar 20 hembras apareadas con cada tipo de macho.

4.2.3 **Experiencia de videograbación**

4.2.3.1-Experiencias unisexuales:

Para el experimento de videograbación se utilizo la misma línea de sexado genético del experimento en jaulas de campo, cedida por IG/CNIA/INTA Castelar en estadio de larva o pupa.

El comportamiento de éstas se comparó con moscas salvajes obtenidas de guayabas atacadas que fueron recolectadas durante el mes de marzo y abril en una población natural en Concordia, Pcia de Entre Ríos (31° 21' latitud S, 58° 1' longitud O). Los adultos se envejecieron hasta 11 días en la cámara de cría. Se utilizaron para el experimento de videograbación machos de ambos grupos (línea T228 y moscas salvajes), enfrentados siempre con hembras salvajes.

El experimento se realizó entre el 30 de abril y el 29 de junio de 1998. El número total de grabaciones fue de 40.

Cada mañana se colocaron dos machos, uno de cada línea, en cada caja de apareamiento. Los machos fueron previamente diferenciados con marcas de color. Los dos machos que primero comenzaron a llamar, en forma continua durante 5 minutos, fueron elegidos para la primer grabación.

Se empezó a grabar acercando el "zoom" al máximo sobre los machos llamando para permitir reconocer detalles, corroborar la llamada del macho y posibles interacciones

entre ellos. Pasados 10 minutos se colocó la lente en posición "wide" (vista panorámica de la cámara de observación) y se liberó la hembra dentro de la caja de apareamiento. Desde este momento se grabó durante 30'. Cada día se hicieron dos grabaciones.

4.2.3.2 Experiencias bisexuales

En este experimento se comparó el comportamiento de machos y hembras de la línea T228 con el de moscas moscas salvajes obtenidas de frutos de *Passiflora sp* atacados que fueron recolectados durante el mes de noviembre de 1999 en una población natural en Buenos Aires (alrededores de Ciudad Universitaria).

Se utilizaron para el experimento de videograbación machos de ambos grupos (línea T228 y moscas salvaje), enfrentados con hembras de ambos grupos.

El experimento se realizó en diciembre de 1999 y enero de 2000. El número total de grabaciones fue de 20.

Cada mañana se colocaron dos machos, uno de cada cepa, en cada caja de apareamiento, diferenciados por medio de marcas de colores en el nototórax.

Luego de grabar durante 10' a los machos llamando, se liberaron dentro de la caja de apareamiento dos hembras, una de cada línea, también marcadas con pintura al agua. Se grabó el comportamiento de machos y hembras durante 30'. Cada día se hicieron dos grabaciones.

Análisis estadístico

Se comparó el tiempo empleado en las diferentes actividades del cortejo entre individuos de distintas líneas utilizando la prueba de Mann-Whitney.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Experiencia en jaulas de campo

4.3.1.1 Porcentaje de apareamiento

El éxito copulatorio relativo de la línea T228 frente a la línea Mendoza se indica en la tabla IV-1. La relación entre líneas y el número de apareamientos fue analizada por medio de una prueba Chi cuadrado. El resultado indica que el número de machos exitosos no difiere entre líneas cuando los machos de T228 no fueron irradiados. Sin embargo, los machos de la línea de sexado genético irradiados tenían un éxito copulatorio significativamente menor que los de Mendoza.

Tabla IV-1. Número y porcentaje (entre paréntesis) de machos apareados de cada línea en cada experimento, NI= machos no irradiados de la línea T228; I= machos irradiados de la línea T228

	NI	I
T228	145 (54%)	51 (26%)
Mendoza	123 (46%)	145 (73%)
Total Apareados	268 (82%)	196 (89%)
χ^2(GL=1)	3.26	76.2
P	0.07	$<10^{-6}$

4.3.1.2 Tiempo de cópula

La mayor tasa de apareamiento se observó entre las 9:00 y las 11:00 horas, siendo ésta muy baja después de las 11:00 hs puesto que la mayor parte de las hembras estaban ya apareadas.

El tiempo de cópula promedio (en minutos) para los machos T228 no irradiados e irradiados y machos de Mendoza fue de 217, 179 y 208 respectivamente (Fig. IV-1). Al comparar estos valores mediante un análisis de varianza se obtuvo un resultado significativo (F= 3.7; P=0.026), debido fundamentalmente a la diferencia entre irradiados y no irradiados de la línea autosexante (P= 0.029). Los restantes contrastes de Scheffé no fueron significativos.

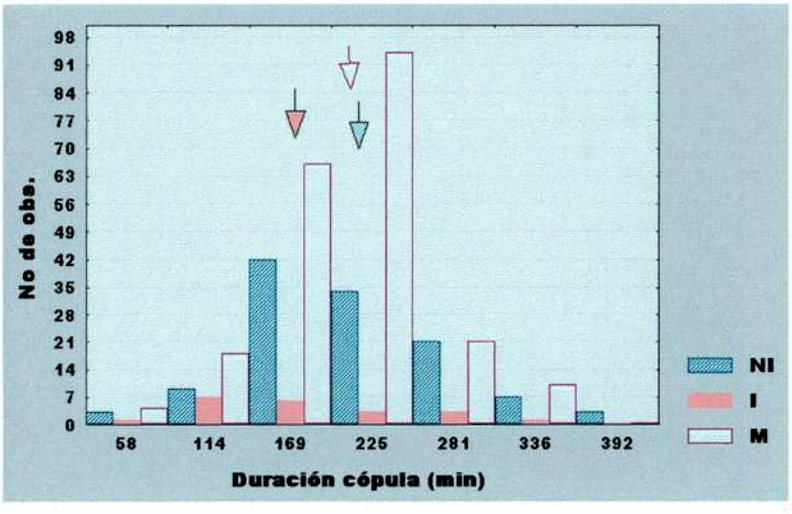


Figura IV-1. Duración de la cópula (min.) para machos de la línea Mendoza (M) y machos de la línea T228, no irradiados (NI) e irradiados (I). Las flechas indican el valor medio para cada grupo.

4.3.1.3 Distribución de las cópulas en la jaula

Se analizó, por medio de una prueba Chi cuadrado, si existían diferencias entre los grupos en cuanto a la distribución de las cópulas en distintos lugares de la jaula (Tabla IV-2). Al considerar distintas partes anatómicas del árbol (cara adaxial o abaxial de la hoja, tronco, red) no se encontraron diferencias significativas entre líneas. En todos los casos la mayor proporción de parejas se formó en la cara abaxial de la hoja.

Tabla IV-2. Distribución (en porcentaje) de las cópulas en distintos sitios del árbol y en la red, en el experimento de jaulas de campo.

	Mendoza	T228	
		No irradiada	Irradiada
Hoja, lado adaxial	9%	9%	2%
Hoja, lado abaxial	71%	67%	72%
Tronco	1%	2%	4%
Red	19%	22%	22%
N° de cópulas	266	145	50

$\chi^2 = 5.41$, GL = 6, p = 0.49

Tampoco se vieron diferencias significativas entre líneas con respecto a la altura del árbol en la cual fue censada la pareja. Como puede verse en la tabla IV-3 en los tres grupos las parejas se encontraron mayoritariamente en el tercio medio.

Tabla IV-3: Porcentajes de cópulas a diferentes alturas del árbol en el experimento de jaulas de campo.

	Mendoza	T228	
		No irradiada	Irradiada
Tercio superior	25%	21%	24%
Tercio medio	35%	35%	38%
Tercio inferior	21%	21%	16%
Red	19%	22%	22%
N° de cópulas	266	145	50

$\chi^2 = 1.69$, GL = 6, p= 0.94

Se pudo observar también que los machos de ambas líneas formaban de manera conjunta grupos o "leks. El número de machos por lek era de 3 a 6 y éstos se forman en general en la parte central de la copa del árbol, variando su posición a lo largo del día.

4.3.2 Análisis de transferencia de esperma

De los 60 pares de espermatecas analizados 59 contenían esperma, el par que se observó vacío pertenecía a una hembra apareada con un macho de la línea autosexante irradiado, dicha cópula había durado sólo 60 minutos.

4.3.3 Experiencia de videograbación

4.3.3.1 Experiencia unisexual

Se reconocieron todas las etapas del cortejo del macho mencionados en el Capítulo II. Además, como consecuencia de las interacciones múltiples y entre machos se hizo necesario definir las siguientes actividades (Fig. IV-2):

WS: "Wing signaling"= Señales de alas las realizan tanto machos como hembras, en forma recíproca, o independientemente uno de otro. Las mismas consisten en colocar las alas perpendicularmente al cuerpo y moverlas suavemente hacia adelante y hacia atrás, a la vez que los individuos se desplazan lateralmente hacia un lado y hacia el otro. El significado biológico de este despliegue de alas no está claro

Fa → ***m***: un macho realiza fanning, pero al detectar la presencia del otro macho, no de la hembra.

B → ***m***: el macho realiza buzzing al enfrentar a otro macho.

A: attemp, intentos de apareamiento entre machos. Según el macho de referencia se distinguen:

- **A** → ***m***: el macho bajo observación intenta aparearse con el otro macho.
- **A** ← ***m***: el otro macho intenta montar sobre el macho bajo observación.

Fi: se observaron peleas entre machos:

- **Fi** → ***m*** : hay agresividad por parte del macho observado hacia el otro, o los dos en forma conjunta
- **Fi** ← ***m***: hay agresividad del otro macho hacia el observado.

H ↔ H: "Head counter head". Dos machos se pegan cara contra cara y se mantienen así por varios segundos (hasta 3 minutos) sin moverse hasta que se separan. Aparentemente no realizan fuerza visible durante este comportamiento y parece una actividad de competencia entre ellos en la cual uno de los machos resulta dominante.

También se estudió el comportamiento de la hembra, observando las siguientes actividades:

S ("Stationary"): permanece quieta o limpiándose.

S_A: igual que S, enfrentada al macho de la SSG a menos de 3 cm

S+: igual que el anterior pero enfrentada al macho salvaje a menos de 3cm

M ("Mobile"): se desplaza por la caja o vuela.

Fi → m_A: la hembra ataca al macho de la SSG o la agresión es mutua

Fi ← m_A: la hembra es agredida por el macho T228

Fi → m+: la hembra ataca al macho salvaje o la agresión es mutua

Fi ← m+: la hembra es agredida por el macho salvaje.

PA_A: Recepción pacífica del intento de cópula del macho T228

PA+: Idem al anterior pero con macho salvaje.

VA_A: Reacción violenta ante el intento de cópula del macho T228

VA+: Idem al anterior pero con el macho salvaje.

C_A: copula con macho de la SSG

C+: cópula con el macho salvaje.

WS: señales de alas de la hembra

Ov.: La hembra está quieta en un lugar y realiza intentos de clavar el ovipositor.

Con el análisis de las videograbaciones se reconocieron las actividades mencionadas y se caracterizó el patrón de cortejo de 40 machos de la línea T228, 40 machos salvajes y 40 hembras salvajes.

Las frecuencias absolutas de machos exitosos y no exitosos (Tabla IV-4) fueron idénticas en ambos grupos.

Tabla IV-4. Número de machos de *C. capitata* exitosos y no exitosos en videograbaciones de apareamientos de machos salvajes y de laboratorio con hembras salvajes.

LINEA	EXITOSOS	NO EXITOSOS	TOTAL
Salvaje	7	33	40
T228	7	33	40
Total	14	66	80

Cuando se comparó el tiempo empleado por los machos para cada actividad entre líneas y entre exitosos y no exitosos se observaron algunas diferencias. En la tabla IV-5 se muestra el tiempo utilizado por los machos en los primeros 10 min. de filmación, en ausencia de la hembra.

Tabla IV-5. Tiempo (seg) usado para cada actividad desplegada por los machos en los primeros 10 min. en ausencia de la hembra.

	T228		Salvaje	
	Exitosos	No Exitosos	Exitosos	No Exitosos
S	2,1	107,4	7,7	36
M	32,1	70,8	39,7	72,5
CS	446,6	328,7	431,7	426,0
CM	75,1	37,7	41,6	32,3
Fa	36,7	47,0	66,7	26,2
B	0,3	0,6	0,0	0,3
A → *m*	1,1	0,7	0,0	0,0
A ← *m*	0,0	0,0	0,9	0,5
Fi → *m*	0,6	1,9	1,2	1,2
Fi ← *m*	0,4	0,4	0,7	0,6
H ↔ H	5,0	3,9	6,9	3,5
WS	0,0	1,0	2,9	0,9

Todas las comparaciones del tiempo empleado en las diferentes actividades del macho y de la hembra entre líneas y entre exitosos y no exitosos se hicieron utilizando la prueba de Mann-Whitney.

Como pude verse en las tablas IV-5 y IV-6, en ausencia de la hembra las diferencias entre exitosos y no exitosos son significativas sólo para la línea T228. Los exitosos emplean más tiempo en CM que los no exitosos y estos últimos pasan mas tiempo en la actividad S.

Comparando las dos líneas se ven diferencias significativas en los intentos de cópula entre machos (A→m). Los machos de la línea T228 realizan más intentos de aparearse

con el otro macho que los salvajes. Estos últimos por su parte pasan más tiempo realizando CS en ausencia de la hembra que los de la LSG.

Tabla IV-6: Resultados test de Mann-Witney para los primeros 10' de actividad de los machos en ausencia de la hembra.

	Linea A vs +		Ex. vs NoEx.		A Ex. vs NoEx		+ Ex. vs noEx	
	Z	p	Z	P	Z	p	Z	p
S	1.288	0.197	-1.887	0.059	-2.150	**0.031**	-0.297	0.767
M	0.304	0.761	-0.103	0.918	-0.253	0.801	0.073	0.942
CS	-1.993	**0.046**	0.399	0.690	1.230	0.219	-0.623	0.533
CM	1.315	0.188	2.890	**0.003**	2.481	**0.013**	1.852	0.064
Fa	0.533	0.594	0.863	0.388	0.037	0.971	1.322	0.186
B	2.154	**0.031**	-0.426	0.670	-0.296	0.767	-0.461	0.645
A → *m*	1.993	**0.046**	-0.181	0.856	0.029	0.977	-0.461	0.645
A ← *m*	-1.562	0.118	-0.328	0.742	-0.660	0.509	0.029	0.977
Fi → *m*	1.284	0.199	0.239	0.811	-0.705	0.481	1.108	0.267
Fi ← *m*	-1.089	0.276	0.908	0.364	0.561	0.575	0.681	0.496
H ↔ H	-0.298	0.765	0.415	0.678	0.376	0.707	0.217	0.828
WS	-0.368	0.712	-0.439	0.661	-0.957	0.338	0.279	0.780

[a] **A**: machos línea T228, +: machos salvajes. [b] **Ex**: machos exitosos, **No Ex**: machos no exitosos

Cuando se comparó el tiempo empleado por los machos de las dos líneas para cada actividad en presencia de la hembra, utilizando la misma prueba no paramétrica (Tablas IV-7 y IV-8) se vio que los machos de la línea de sexado genético realizan más buzzing al otro macho (B→m) y más intentos de apareamiento con el macho (A→m). Por el contrario, el macho salvaje es sometido a más intentos de apareamientos (A←m) y agresiones (Fi←m) por el T228. Es decir, que los individuos de la línea T228 son más

agresivos y realizan más intentos de apareamiento con los machos salvajes y más buzzing con éstos, a pesar de que estas dos actividades son propias del cortejo con la hembra.

Tabla IV-7. Tiempo en segundos empleado en cada actividad por los machos en los 30' en presencia de la hembra.

	T 228		Salvaje	
	Exitosos	No Exitosos	Exitosos	No Exitosos
S	38,5	348,7	19,9	271,9
M	34,0	266,7	66,3	312,8
CS	623,0	837,8	481,9	973,7
CM	107,4	85,4	42,7	95,2
Fa	1,1	104,2	5,0	21,9
Fa → h	77,1	75,2	15,3	60,2
Fa → m	8,1	49,5	0,6	27,6
B → h	16,4	5,9	9,4	9,2
B → m	2,7	3,5	0,0	0,3
PA	34,9	0,0	12,4	0,1
VA	0,6	0,8	0,0	1,2
A → m	0,4	8,2	0,0	0,1
A ← m	0,0	0,1	0,9	8,0
Fi → m	1,1	3,3	0,4	2,3
Fi → h	0,8	0,8	0,6	1,2
Fi ← m	0,0	0,3	0,0	2,3
Fi ← h	0,0	0,2	0,6	0,7
H ↔ H	0,9	3,6	0,0	6,5
C	851,4	2,8	1143,7	0,0
WS	1,4	2,8	0,4	4,7
MJ	0,0	0,0	0,0	0,2

Tabla IV-8: Resultados de la prueba de Mann-Witney para los 30' de actividad de los machos en presencia de la hembra.

	Linea A vs +		Ex. vs NoEx.		A Ex. vs NoEx		+ Ex. Vs noEx	
	Z	p	Z	p	Z	P	Z	p
S	-0.203	0.838	-2.868	**0.004**	-1.381	0.167	-2.667	**0.007**
M	-1.392	0.164	-3.758	**0.000**	-2.581	**0.009**	-2.802	**0.005**
CS	-0.789	0.430	-1.818	0.069	-0.588	0.556	-1.940	0.052
CM	0.593	0.553	-0.672	0.501	0.750	0.453	-1.621	0.105
Fa	0.999	0.318	-1.876	0.061	-2.136	**0.033**	-0.366	0.714
Fa → h	0.000	1	1.825	0.068	1.714	0.086	0.677	0.498
Fa → m	1.521	0.128	-1.914	0.055	-1.074	0.283	-2.112	**0.034**
B → h	0.337	0.736	4.147	**0.000**	3.041	**0.002**	2.769	**0.005**
B → m	3.531	**0.000**	-0.717	0.473	-0.594	0.552	-0.660	0.509
PA	-0.141	0.887	8.591	**0.000**	6.207	**0.000**	5.884	**0.000**
VA	0.000	1	-0.928	0.353	-0.115	0.909	-1.203	0.228
A → m	3.311	**0.001**	-0.325	0.745	-0.308	0.758	-0.461	0.645
A ← m	-2.556	**0.011**	-0.846	0.397	-0.660	0.509	-0.632	0.527
Fi → m	1.542	0.123	-2.256	**0.024**	-1.885	0.059	-1.132	0.257
Fi → h	-0.185	0.853	-0.625	0.532	0.251	0.802	-1.208	0.227
Fi ← m	-3.420	**0.001**	-2.916	**0.003**	-1.317	0.188	-2.772	**0.005**
Fi ← h	-1.640	0.101	-0.698	0.485	-0.818	0.413	-0.280	0.779
H ↔ H	-0.412	0.680	-0.297	0.766	0.662	0.507	-0.957	0.338
C	0.155	0.876	8.591	**0.000**	5.884	**0.000**	6.207	**0.000**
WS	-1.163	0.245	-0.555	0.579	0.062	0.951	-0.755	0.450
MJ	0.981	0.326	-0.939	0.348	-0.818	0.413	-0.461	0.645

[a] **A**: machos línea T228, +: machos salvajes. [b] **Ex**: machos exitosos, **No Ex**: machos no exitosos

También se compararon los machos exitosos con los no exitosos, encontrando diferencias significativas para algunas actividades. De acuerdo con estos resultados, los

individuos no exitosos emplean más tiempo que los exitosos en actividades como S, M , Fi→m y Fi←m y menos en B hacia la hembra y PA. Es decir que los no exitosos usan más tiempo en realizar actividades no reproductivas (S y M), hay más comportamientos agresivos entre los machos e invierten menos tiempo en las etapas indispensables para un cortejo exitoso.

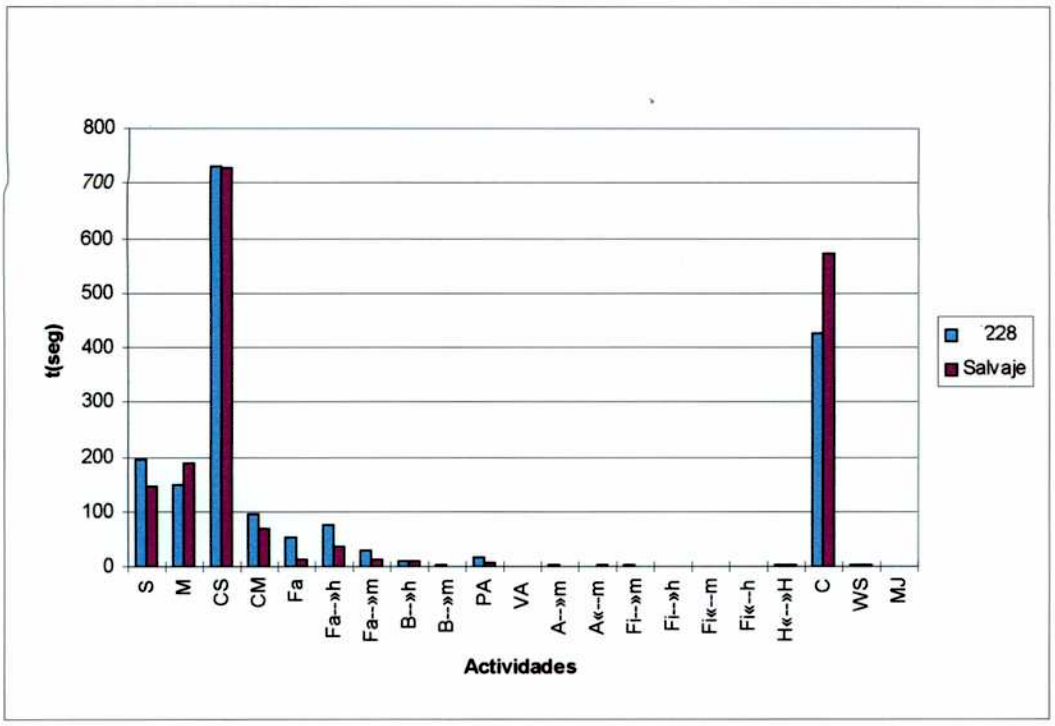
Comparando con la misma prueba estadística las actividades de la hembra (tabla IV-9), se encontraron diferencias entre hembras apareadas y no apareadas en unas pocas actividades. Las no apareadas realizan S, M y WS durante más tiempo.

Tabla IV-9: Tiempo (seg) empleados por las hembras para cada actividad y resultados test de Mann-Whitney.

	Apareadas	NoApareadas	MW (Z)	p
S	642,6	1270,8	3.346	**0.001**
M	104,2	423,8	3.176	**0.001**
S_A	11,0	14,7	-0.740	0.459
S+	5,4	20,6	0.807	0.419
Fi → m_A	0,2	1,0	1.048	0.295
Fi → m+	0,0	2,7	3.104	**0.002**
Fi ← m_A	0,4	0,3	-0.543	0.587
Fi ← m+	0,8	0,5	0.168	0.867
PA_A	17,4	0,0	-3.896	0.000
PA+	6,2	0,0	-3.896	0.000
VA_A	0,4	1,1	0.535	0.592
VA+	0,0	1,5	2.099	0.036
C_A	425,7	0,0	-3.896	0.000
C+	571,9	0,0	-3.896	0.000
WS	2,6	13,9	2.547	**0.011**
Ov.	11,3	49,2	0.517	0.605

Figura IV-2. Actividades desplegadas por los machos, en condiciones donde la competencia intrasexual está presente. A) "Head to head", B) Un macho realiza "Fanning" al otro, C) Machos realizando "Fanning", D) Machos realizando "Calling" y "Fanning" en presencia de la hembra.

a



b

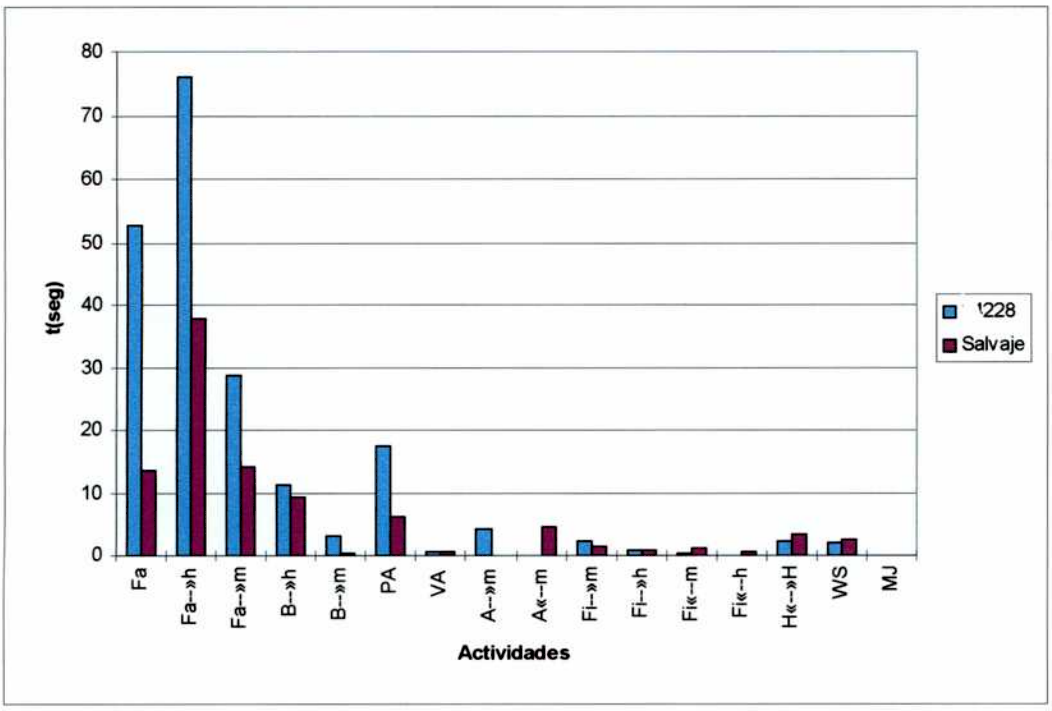
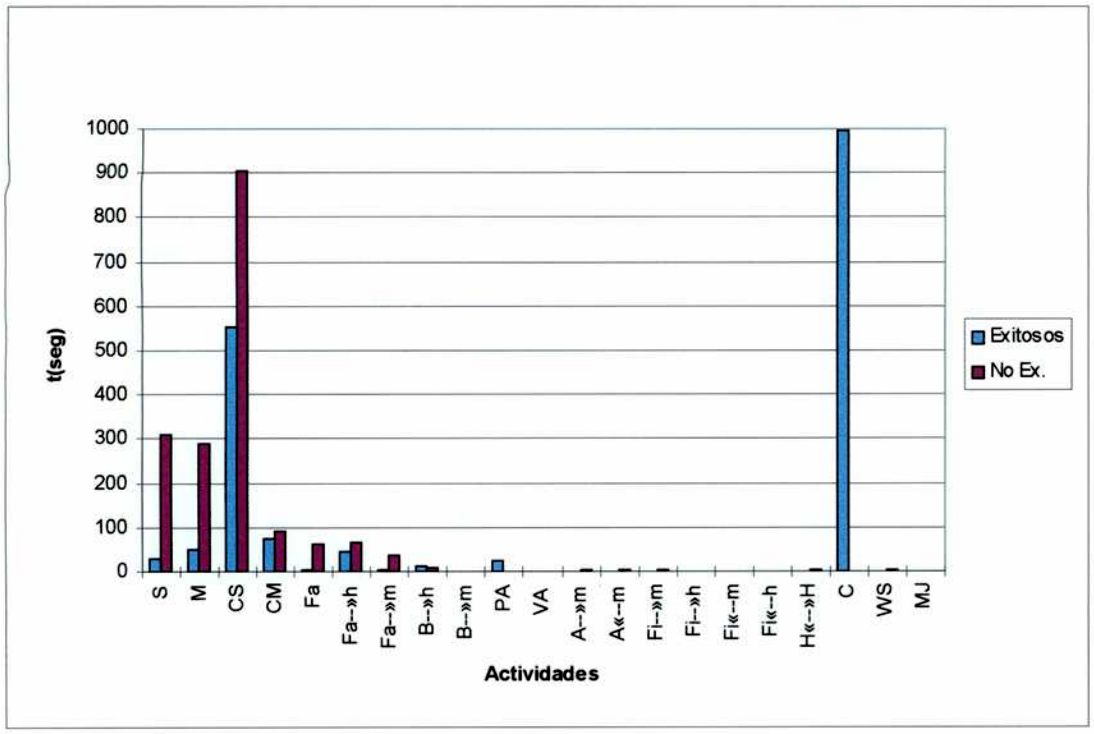


Figura IV-3: a) Comparación entre líneas del tiempo empleado por los machos en cada actividad en presencia de la hembra. b) Idem al anterior pero descartando las actividades en las que emplean más tiempo.

a



b

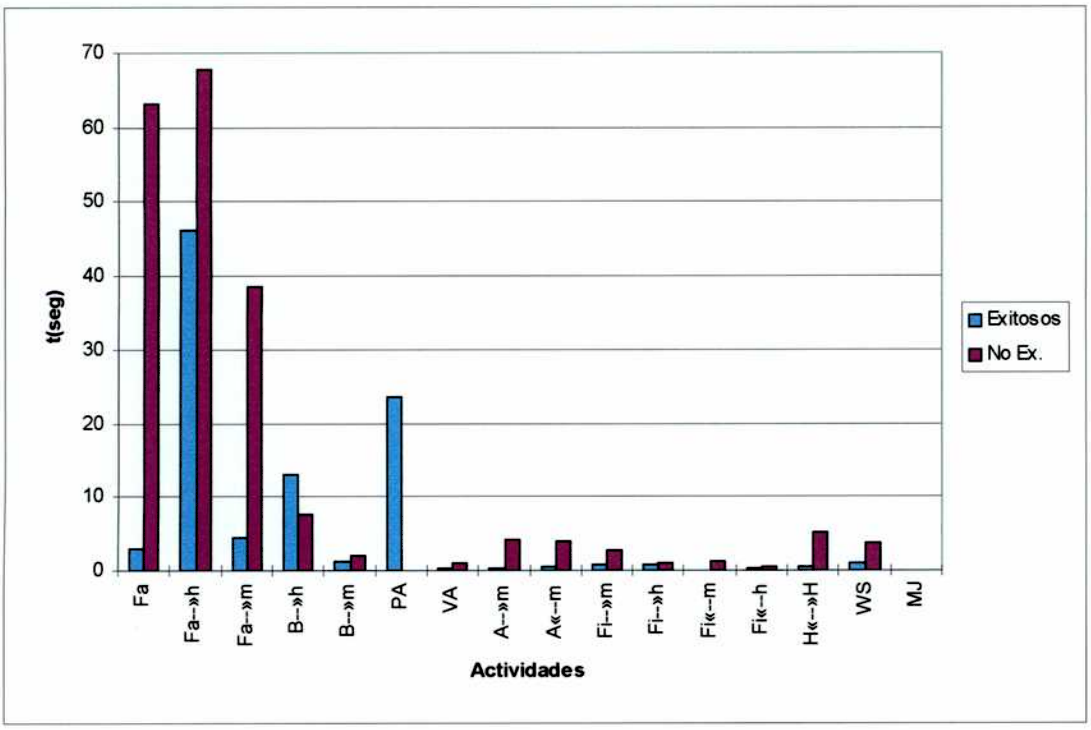
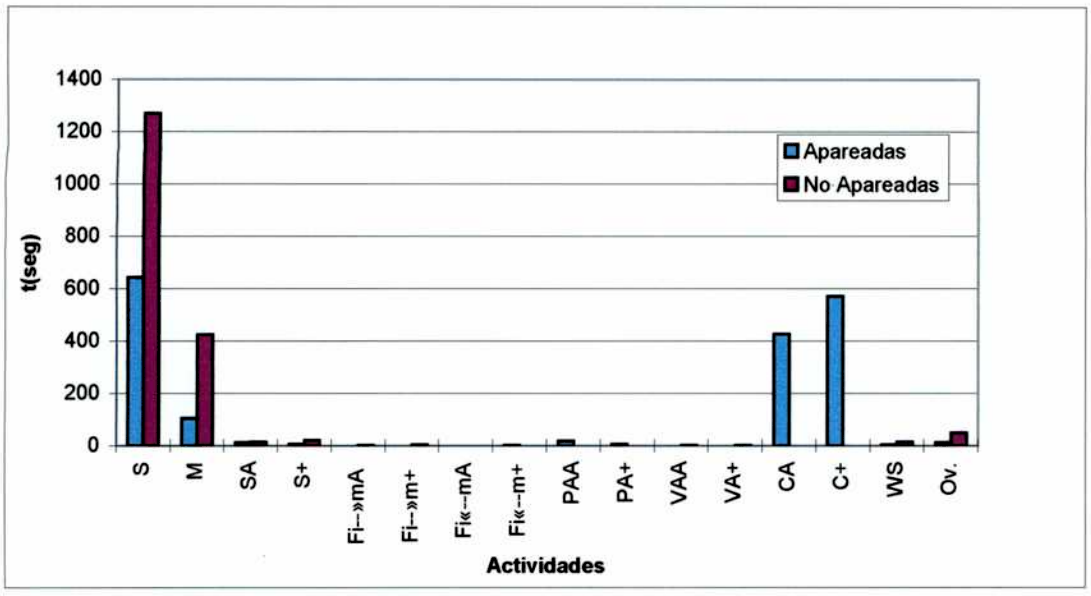


Figura IV-4. a) Comparación entre machos exitosos y no exitosos del tiempo empleado en las diferentes actividades, en presencia de la hembra. b) La misma comparación descartando las actividades en las que emplean más tiempo.

a



b

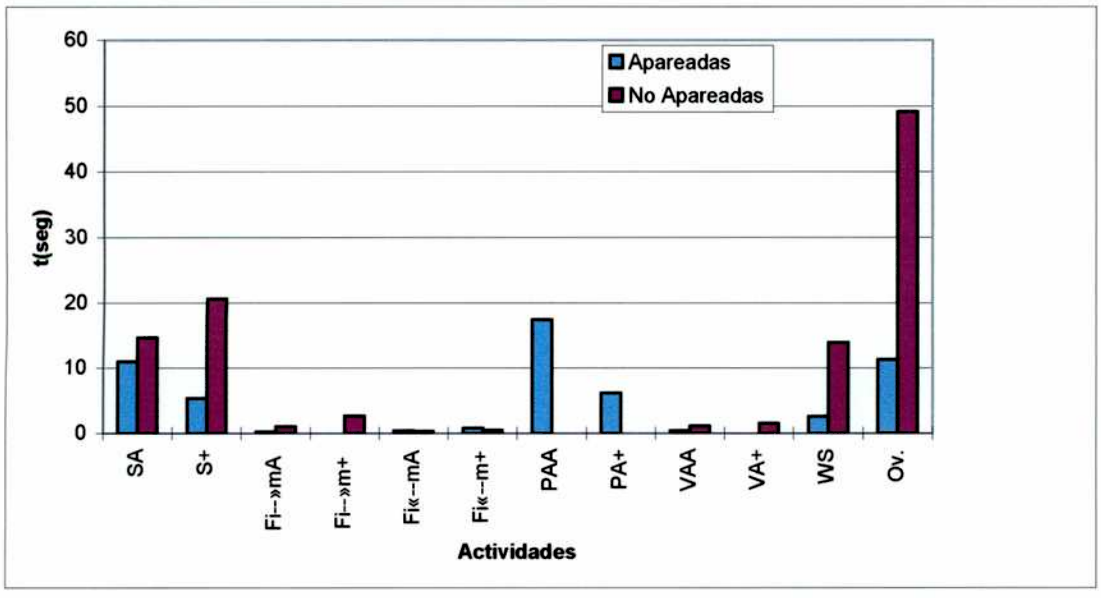


Figura IV-5. a)Comparación entre hembras apareadas y no apareadas del tiempo empleado para distintas actividades, b)La misma comparación eliminando las actividades en las que las hembras emplean más tiempo.

4.3.3.2 Experiencia bisexual

Con el análisis de las videograbaciones se reconocieron las actividades mencionadas y se caracterizó el patrón de cortejo de 20 machos de la línea T228 y 20 machos salvajes. La comparación de las frecuencias de cortejos exitosos entre machos de distintas líneas (Tabla IV-10) indica que no hay diferencias significativas entre líneas (χ^2= 0.42, *P*= 0.52).

Tabla IV-10: Número de cópulas entre las dos líneas y número de machos y hembras no exitosos.

		HEMBRA		Machos
	Línea	**T228**	**Salvaje**	**No Ex.**
MACHO	**T228**	8	3	9
	Salvaje	6	4	10
Hembras no Apareadas		6	13	

Comparando las frecuencias absolutas de las hembras apareadas y no apareadas (Tabla IV-10) sí se encontraron diferencias significativas entre líneas (χ^2= 4.9, p= 0.026), siendo mayor el éxito de la T228.

Cuando el tiempo empleado para cada actividad de los machos fue comparado entre líneas y entre exitosos y no exitosos se observaron algunas diferencias. En la tabla IV-11 se muestra el tiempo que fue utilizado por los machos para diferentes actividades en los primeros 10 min. de video grabación, en ausencia de las hembras.

Tabla IV-11. Tiempo (seg) empleado para cada actividad desplegada por los machos en los primeros 10 min.

	T228		Salvaje	
	Exitosos	No Exitosos	Exitosos	No Exitosos
S	15.22	141.22	7.20	51.60
M	35.23	113.60	31.99	108.05
CS	446.82	239.78	441.30	377.90
CM	70.68	46.00	41.10	30.30
Fa	37.36	47.39	62.90	24.40
B	0.27	1.22	0.20	0
A → *m*	1.00	1.89	0	0
A ← *m*	0	0	0.95	0.90
Fi → *m*	0.68	1.23	1.15	0.70
Fi ← *m*	0.45	0.55	0.71	0.45
H ↔ H	5.00	5.33	5.80	4.00
WS	0.45	1.70	2.70	1.70

Todas las comparaciones del tiempo empleado en las diferentes actividades del macho entre líneas y entre exitosos y no exitosos se hicieron utilizando la prueba de Mann-Whitney.

Como pude verse en las tablas IV-11 y IV-12, en ausencia de las hembras se ven diferencias significativas entre las líneas en los intentos de cópula entre machos (A→m) (Fig. IV-6 b). Los machos de la línea T228 realizan más intentos de cópula con el otro macho que los salvajes, además los machos de laboratorio pasan más tiempo llamando y desplazándose (CM) que los salvajes (Fig. IV-6a y b).

Entre machos exitosos y no exitosos hay algunas diferencias significativas, para la línea autosexante. En esta línea los exitosos emplean más tiempo en CS que los no exitosos (Fig. IV-7 a) y estos últimos pasan mas tiempo en la actividad S (Fig. IV-7 a y b). Es decir que los que van a ser exitosos antes de la presencia de la hembra muestran mayor propensión para la cópula, realizando más llamado, mientras que los no exitosos permanecen más tiempo quietos.

En los salvajes las diferencias entre exitosos y no exitosos son significativas para llamado móvil (CM), realizado con más frecuencia por los exitosos.

Tabla IV-12: Resultados test de Mann-Witney para los primeros 10' de actividad de los machos en ausencia de las hembras.

	Linea A vs + [a]		Ex. vs NoEx.[b]		A Ex. vs NoEx		+ Ex. vs noEx	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
S	-0.520	0.603	-2.448	**0.014**	-2.536	**0.011**	-0.873	0.382
M	0.326	0.744	-0.749	0.454	-0.723	0.469	-0.421	0.673
CS	-1.326	0.185	1.599	0.110	2.245	**0.024**	0.226	0.821
CM	2.707	**0.007**	1.992	**0.046**	1.028	0.304	1.967	**0.049**
Fa	-0.232	0.817	1.065	0.287	0.231	0.817	1.366	0.171
B	1.436	0.151	0.212	0.832	-0.435	0.663	1.000	0.317
A → *m*	2.078	**0.038**	-0.104	0.917	-0.217	0.827	0.000	1.000
A ← *m*	-2.078	**0.038**	-0.104	0.917	0.000	1.000	0.000	1.000
Fi → *m*	0.216	0.829	-0.058	0.954	-1.000	0.317	0.892	0.372
Fi ← *m*	-0732	0.464	0.570	0.568	0.099	0.920	0.641	0.521
H ↔ H	-0327	0.744	0.266	0.790	0.305	0.760	0.108	0.914
WS	-0.213	0.831	-0.814	0.415	-1.359	0.174	0.108	0.914

[a] **A**: machos línea T228, +: machos salvajes

[b] **Ex**: machos exitosos, **No Ex**: machos no exitosos

Cuando se comparó el tiempo empleado por los machos de las dos líneas para cada actividad, en presencia de las hembras, utilizando la misma prueba no paramétrica (Tablas IV-13 y IV-14 se vio que los machos de la línea autosexante realizan más fanning y buzzing al otro macho (Fa→m, B→m) y más intentos de apareamiento con el macho (A→m). Por el contrario el macho salvaje es sometido a más intentos de apareamientos por el T228 (A←m) (Fig. IV-8). Es decir, que en consistencia con lo observado en la experiencia unisexual, los individuos de la línea autosexante realizan más intentos de apareamiento con los machos salvajes y más fanning y buzzing con éstos. Asimismo los machos salvajes son más agredidos por las hembras salvajes que los de laboratorio.

También se compararon los machos exitosos con los no exitosos, encontrando diferencias significativas para algunas actividades (Fig. IV-9 a y b). De acuerdo con estos resultados, los individuos no exitosos emplean más tiempo que los exitosos en actividades como M, Fi←m y menos en Fa→h B→h y PA. Es decir que los no exitosos usan más tiempo en realizar actividades no reproductivas como moverse sin llamar (M), hay más comportamientos agresivos entre los machos e invierten menos tiempo en las etapas indispensables para un cortejo exitoso (Fa—B—PA).

Tabla IV-13. Tiempo empleado en cada actividad por los machos en los 30' en presencia de las hembras.

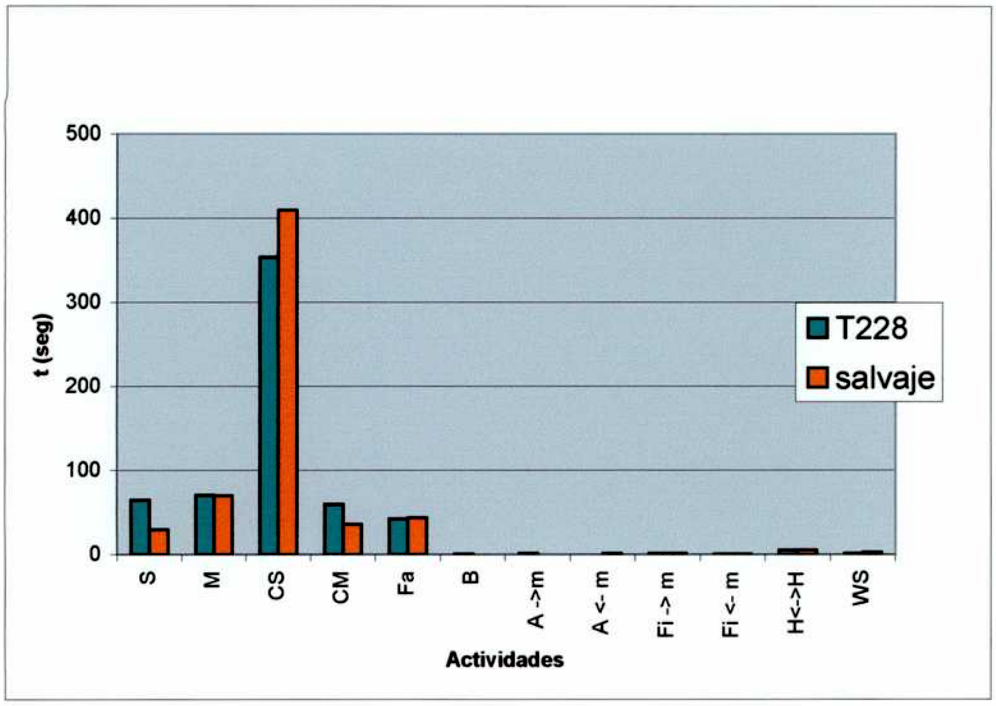
	T228		Salvaje	
	Exitosos	**No Exitosos**	**Exitosos**	**No Exitosos**
S	38.41	407.98	18.90	295.21
M	32.36	207.54	73.20	374.75
CS	656.09	815.33	468.00	1017.95
CM	98.55	94.67	46.30	72.70
Fa	9.45	216.67	4.90	15.00
Fa → hA	34.64	4.89	8.70	5.70
Fa → h+	35.27	7.56	9.70	7.00
Fa → m	7.73	32.86	0.50	0.90
B → hA	11.64	0.00	5.30	0.00
B → h+	6.45	4.56	4.00	0.80
B → m	2.45	4.14	0.00	0.00
PA→ hA	24.36	0.00	7.40	0.00
PA→ h+	5.55	0.00	5.90	0.00
VA→ hA	0.00	0.00	0.00	0.00
VA→ h+	0.36	0.20	0.00	0.60
A → m	0.36	0.89	0.00	0.00
A ← m	0.00	0.00	1.00	0.30
Fi → m	1.01	0.63	0.42	1.29
Fi → hA	0.41	0.11	0.20	0.50
Fi → h+	0.48	0.37	0.28	0.20
Fi ← m	0.00	0.06	0.00	0.88
Fi ← hA	0.00	0.22	0.32	0.12
Fi ← h+	0.00	0.00	0.28	0.30
H ↔ H	1.36	0.00	0.00	0.60
C	831.73	0.00	1144.30	0.00
WS	1.33	1.33	0.40	5.20
MJ	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla IV-14: Resultados test de Mann-Witney para los 30' de actividad de los machos en presencia de las hembras.

	[a]Linea A vs +		Ex. vs NoEx.		A Ex. vs noEx		+ Ex. vs noEx	
	Z	p	Z	p	Z	p	Z	p
S	-0.028	0.978	-1.134	0.257	0.393	0.694	-1.835	0.066
M	-0.777	0.437	-2.443	**0.014**	-1.559	0.118	-2.085	**0.037**
CS	-0.216	0.828	-1.585	0.113	-0.342	0.732	-1.738	0.082
CM	1.804	0.071	0.068	0.945	0.304	0.760	-0.569	0.569
Fa	0.570	0.568	-0.717	0.473	-1.538	0.124	0.646	0.518
Fa → hA	1.577	0.115	3.213	**0.001**	2.927	**0.003**	1.446	0.148
Fa → h+	1.253	0.210	2.950	**0.003**	2.580	**0.009**	1.430	0.152
Fa → m	2.334	**0.019**	0.000	1.000	-0.162	0.871	-0.548	0.583
B → hA	1.016	0.309	4.229	**0.000**	3.087	**0.002**	2.796	**0.005**
B → h+	0.374	0.708	1.905	0.056	1.048	0.294	1.541	0.123
B → m	3.098	**0.002**	-0.232	0.816	-0.515	0.606	0.000	1.000
PA→ hA	0.858	0.391	4.230	**0.000**	3.088	**0.002**	2.797	**0.005**
PA→ h+	-0.388	0.698	2.719	**0.006**	1.649	0.099	2.162	**0.030**
VA→ hA	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000
VA→ h+	0.533	0.594	-0.682	0.495	-0.073	0.942	-1.000	0.317
A → m	2.615	**0.009**	-0153	0.878	-0.329	0.742	0.000	1.000
A ← m	-2.078	**0.037**	0.000	1.000	0.000	1.000	0.216	0.828
Fi → m	0.524	0.600	-0.238	0.811	-0.172	0.863	-0.139	0.888
Fi → hA	0.601	0.548	0.563	0.573	1.251	0.211	-0.608	0.543
Fi → h+	1.074	0.283	0.342	0.732	0.602	0.547	-0.298	0.765
Fi ← m	-1.091	0.275	-2.185	**0.028**	-1.106	0.268	-1.824	0.068
Fi ← hA	-0.987	0.323	-0.104	0.917	-1.106	0.268	0.669	0.503
Fi ← h+	-2.078	**0.037**	-0.104	0.917	0.000	1.000	0.000	1.000
H ↔ H	1.341	0.179	1.225	0.220	1.956	**0.050**	-1.000	0.317
C	-0.258	0.796	5.717	**0.000**	3.943	**0.000**	4.038	**0.000**
WS	-0.444	0.657	-0.148	0.882	0.706	0.479	-0.794	0.426
MJ	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	1.000

[a] **A**: machos línea T228, +: machos salvajes[b] **Ex**: machos exitosos, **No Ex**: machos no exitosos

a



b

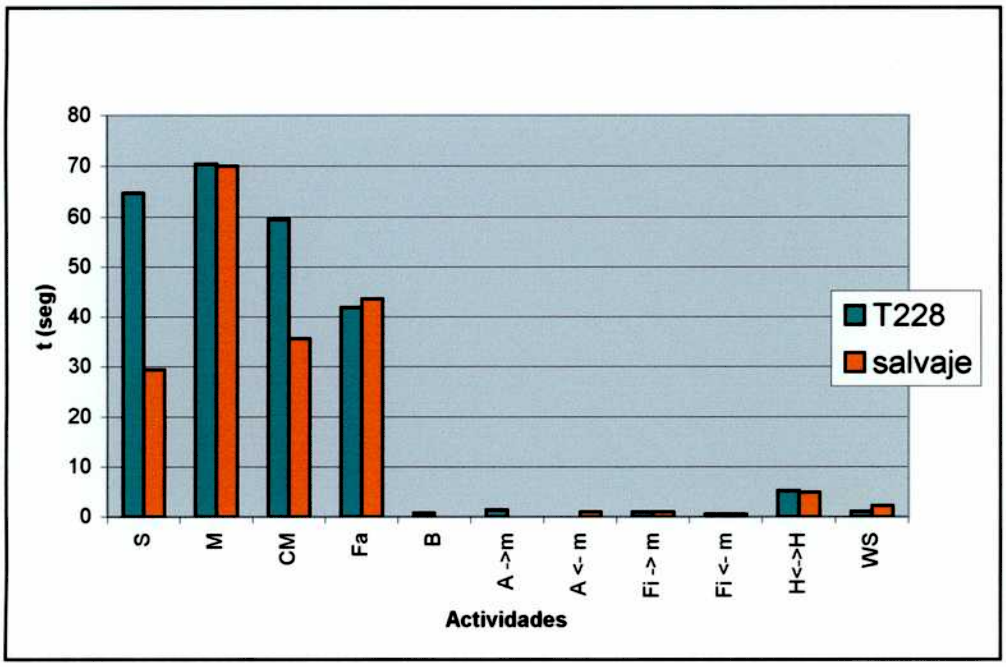
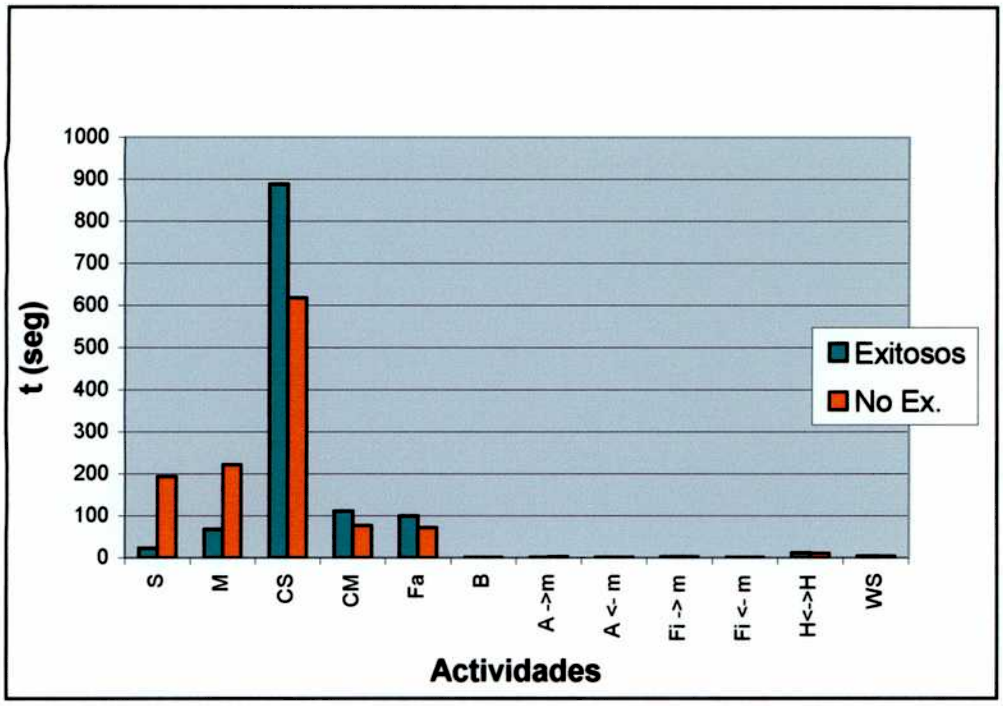


Figura IV-6: a) comparación entre líneas del tiempo empleado por los machos en cada actividad en ausencia de las hembras. b) Idem al anterior pero descartando actividades en las que emplean más tiempo.

a



b

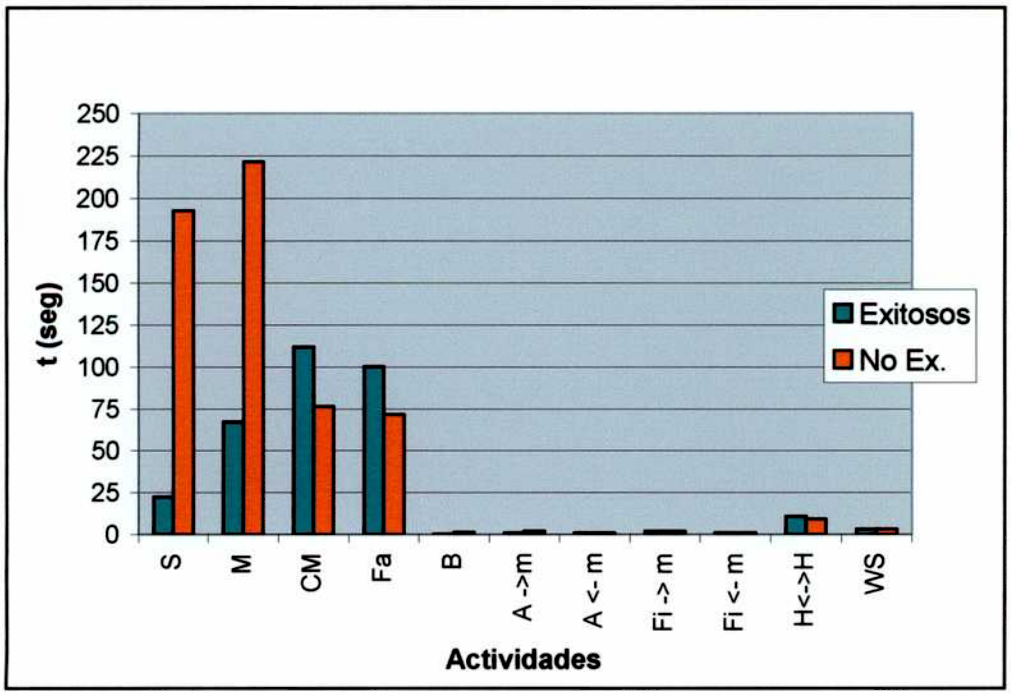
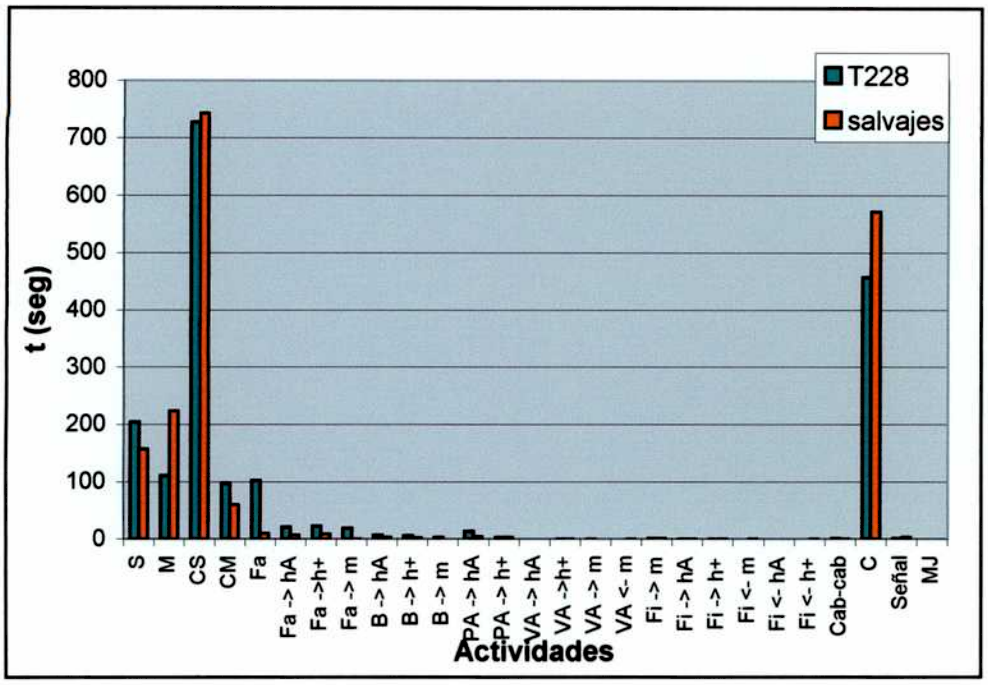


Figura IV-7: a) Comparación entre machos exitosos y no exitosos del tiempo empleado en las diferentes actividades en ausencia de las hembras. b) La misma comparación descartando las actividades en las que emplean más tiempo.

a



b

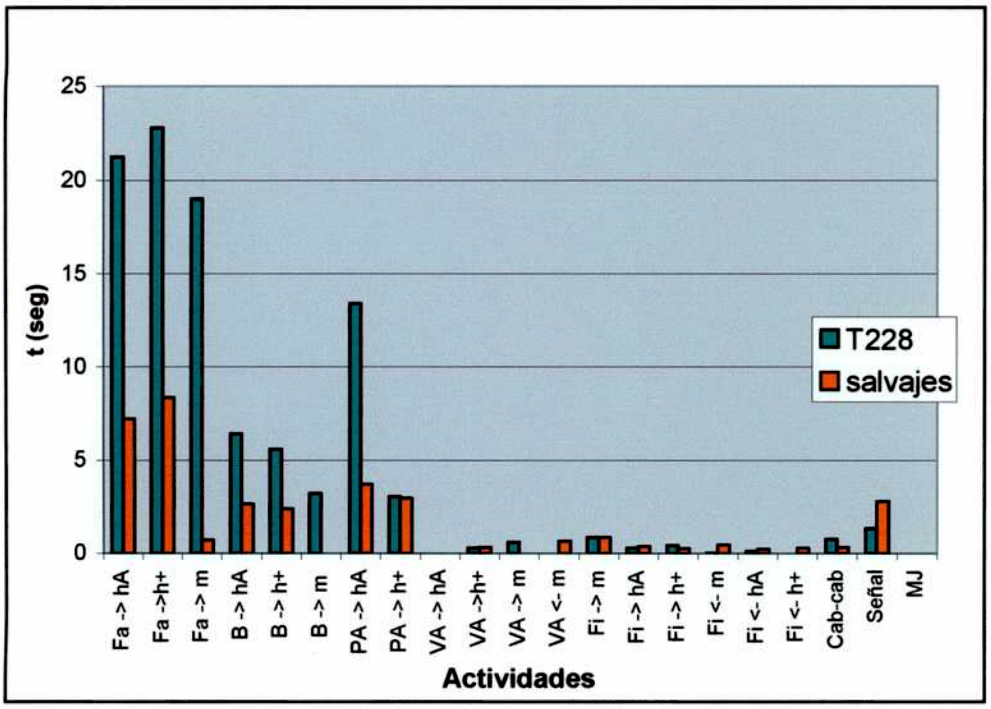
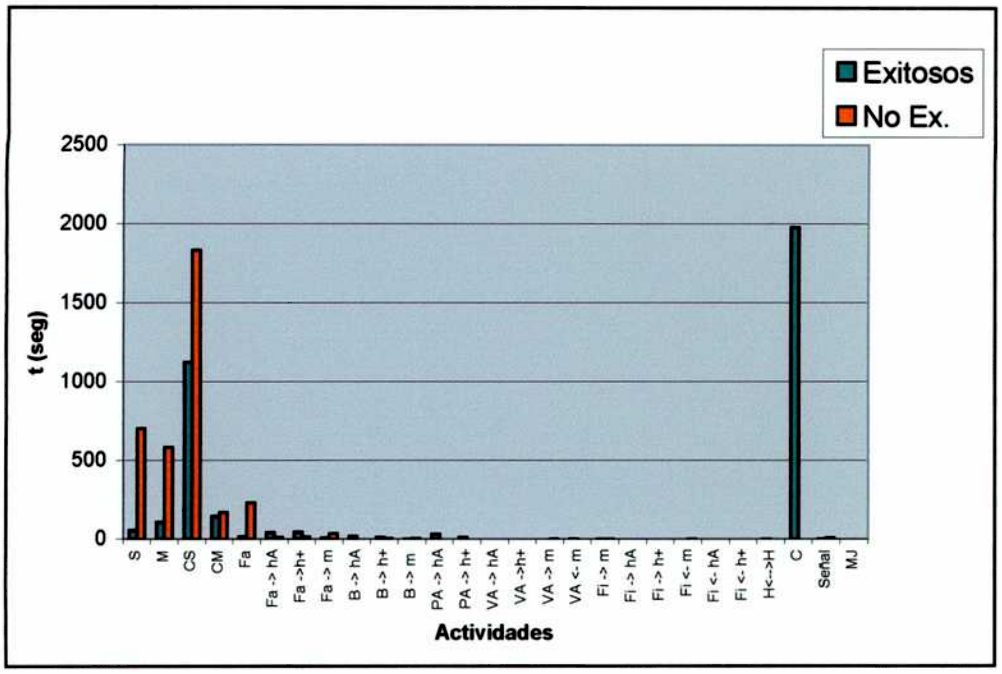


Figura IV-8: Comparación entre líneas del tiempo empleado por los machos en cada actividad en presencia de las hembras. b) Idem al anterior pero descartando las actividades en las que emplean más tiempo.

a



b

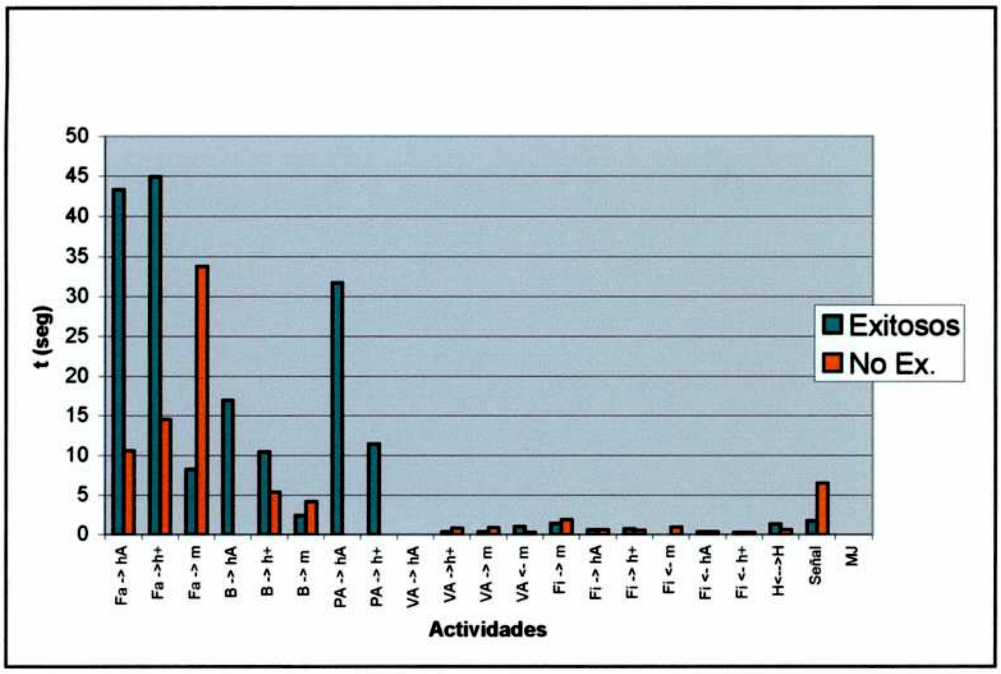


Figura IV-9: a) Comparación entre machos exitosos y no exitosos, del tiempo empleado en las diferentes actividades en presencia de la hembra. b) La misma comparación descartando las actividades en las que emplean más tiempo.

4.4 DISCUSION

4.4.1 Experiencia en jaulas de campo

Los resultados obtenidos en el experimento en jaulas de campo indican que la eficiencia de la línea de sexado genético T228 de *C. capitata* analizada es muy buena en comparación con la de Mendoza. Aunque, los resultados revelan que, el éxito copulatorio en los machos de esta línea disminuye por los radiación recibida. Sin embargo esto se podría compensar, para no reducir la eficiencia de los programas de control y erradicación de esta plaga, porque la cantidad de machos estériles liberados es aproximadamente 100 veces mayor que el número estimado de la población natural. El menor éxito de los individuos que recibieron irradiación se debería a múltiples efectos de la misma, sobre diferentes procesos fisiológicos (Capítulo III).

Una de las observaciones más importantes que se realizaron en esta experiencia fue que los machos de ambas líneas aunque están adaptadas a la cría en laboratorio forman leks estableciendo su territorio en la cara abaxial de hojas vecinas. En condiciones de cría de laboratorio los machos no forman leks, sino que cada macho tiene la misma posibilidad de ser aprobado por una hembra en la jaula, por lo que en el campo estos machos no siempre seleccionan una ubicación específica (Cayol et al. 1999). El número de machos por lek varió de 3 a 6. Este valor coincide con experiencias en jaulas de campo en Guatemala, en las que se utilizaron moscas de una línea de cría masiva (Prokopy y Hendrichs 1979). También se observó que estos leks estaban ubicados en el centro de la copa del árbol cítrico, lo que coincide con los resultados sobre la ubicación de las cópulas en otros experimentos (Arita y Kaneshiro 1989; Hendrichs y Hendrichs 1990)

En este caso la mayor parte de ellas se produjeron en el tercio medio del árbol para las dos líneas incluidos los irradiados. La razón de por qué es preferido un lugar particular del árbol no está claro, pero pueden estar implicados entre otros factores la exposición al sol, densidad del follaje y protección del viento (Arita y Kaneshiro 1989; Hendrichs y Hendrichs 1990; Whittier et al. 1992).

Por lo tanto se puede concluir que la competencia entre machos aparentemente no está alterada porque forman leks aparentemente con la misma localización que lo hacen los salvajes. Se observo en la prueba de campo del presente capítulo, con moscas de laboratorio, y en las presentadas en el capítulo III que las líneas estudiadas se aparearon más temprano en el día que las moscas salvajes (Capítulo I). Esto se debe a que en la naturaleza la iniciación de la actividad diaria es regulada por los cambios en las condiciones ambientales (luz y/o temperatura). En condiciones de cría la temperatura y la humedad son constantes y la transición luz-oscuridad es abrupta. Además, debido a la alta densidad de adultos en las condiciones de cría, los machos deben iniciar la actividad sexual rápidamente en el día para obtener un apareamiento (Calkins 1989b). Por lo tanto las moscas de laboratorio pueden estar seleccionadas para iniciar su actividad sexual más temprano que sus pares silvestres. Blay y Yuval (1997) observaron que los machos alimentados con proteína comenzaban su actividad sexual más temprano que los privados de proteínas. Como los machos de cría laboratorio están alimentados con mas proteínas que los silvestres (Warburg y Yuval 1997a,b), las diferencias en la dieta de los adultos también podrías explicar parcialmente por qué los machos de laboratorio comienzan su actividad sexual antes que los salvajes.

Por otro lado, la duración de la cópula fue significativamente menor en los machos irradiados de la línea T228 que en los no irradiados. Esta diferencia en los tiempos de

cópula podría afectar la transferencia de esperma, como se discutió en el Capitulo III. Si la receptividad de la hembra al reapareamiento está correlacionada con el volumen de esperma en la espermateca (Nakagawa et al. 1971) esto llevaría a que los machos no les transfieren suficiente esperma y las hembras seguirían apareándose hasta encontrar un macho que complete su reservorio de esperma, haciendo fracasar la TIE. Sin embargo, hay estudios en los que se vio que con tiempos de cópula normales puede ocurrir ausencia de transferencia de esperma (Seo et al. 1990). Jang et al. (1998) encontró que los machos de cría masiva mantienen su capacidad de transmitir secreciones glandulares junto con el esperma a las hembras para producir el cambio de comportamiento en estas y que ovipongan. Esto es muy importante para los programas de la TIE porque al producirse el cambio de comportamiento de la hembra se inhibe el reapareamiento.

En el presente estudio la diferencia entre machos irradiados y no irradiados no se vio reflejada en la transferencia de esperma. Si bien no se cuantificó la cantidad de esperma transferido, con una sola excepción, en todos los casos analizados se comprobó que las espermatecas de las hembras apareadas contenían esperma. Esto muestra que la habilidad competitiva de estos machos parece ser semejante a la de los machos no irradiados.

4.4.2 Experimento de videograbación

En este trabajo, el tipo de diseño experimental determina que puede ocurrir interacción entre machos. Por esta razón se puede decir que en este caso el mecanismo de selección sexual está integrado por la selección intrasexual y por la elección de pareja (selección intersexual).

Como era de esperar, en los 10 primeros minutos de grabación no se observaron diferencias en el comportamiento de los machos entre la experiencia unisexual y bisexual. Esto se debe a que en ambos casos solo se encontraba un macho de cada tipo en la caja de apareamiento con ausencia de las hembras. En ambas experiencias al comparar durante estos 10 min. el comportamiento de los machos que luego van a ser exitosos con los que no, se observaron diferencias entre ellos. Es decir, que los que van a ser exitosos aún antes de la presencia de la hembra muestran mayor propensión para la cópula, puesto que realizan más llamado móvil mientras que los no exitosos permanecen más tiempo quietos.

Si bien el éxito copulatorio de ambas líneas es el mismo de acuerdo con los presentes resultados, parece que hubiera diferencias importantes entre ellas que podrían tener influencia en el proceso copulatorio en condiciones diferentes de las correspondientes al experimento. Estas diferencias coinciden en las pruebas uni y bisexuales. En particular, la línea T228 realiza más intentos de apareamientos con los machos salvajes y aleteo intermitente (buzzing) hacia los machos, actividades que son propias del cortejo con la hembra. Esto produce una distracción y podría conducir a perder la oportunidad de realizar el cortejo con una hembra. Además la línea de sexado genético es muy agresiva con los machos salvajes.

Las condiciones de cría en laboratorio están caracterizadas por una drástica reducción de espacio disponible por una gran densidad de individuos y ausencia de requerimientos naturales (formación de leks, frutos). Tal vez la cría en laboratorio favorece un rápido apareamiento con reducción del cortejo (Capítulo II) y además, la mayor cantidad de intentos de cópula con otros machos también podrían deberse a dichas condiciones.

La baja tasa de apareamiento observada para las dos líneas en las pruebas unisexuales pudo deberse al espacio reducido de las cajas de apareamiento, esto aumenta las probabilidades de encuentros entre machos e interrupciones en el cortejo. Las condiciones para la grabación en cajas pequeñas se asemejan más a las condiciones de cría masiva. Es posible, por lo tanto, que los hembras salvajes no se vieran favorecidas en esas condiciones. Otra causa puede ser la competencia entre los machos (intrasexual), ya que, en muchos casos, se veía una casi continua interacción entre ellos. El éxito copulatorio fue bajo en relación con experimentos anteriores (Capítulos II y III), en los que la competencia intrasexual fue removida al colocar un macho y una hembra por caja.

En los ensayos bisexuales no se encontraron diferencias entre líneas en el éxito copulatorio de los machos. En este experimento la tasa de apareamiento fue mayor que en la experiencia unisexual. Esto puede deberse a que en las unisexuales los machos se enfrentaron sólo a hembras silvestres y, como ya se comentó previamente, éstas no se ven favorecidas para el apareamiento en las condiciones del experimento (espacio reducido en las cajas de apareamiento, falta de agregación de machos en leks que permite a las mismas una mayor posibilidad de la elección de su pareja). Esta hipótesis se vería apoyada por los resultados del presente experimento que mostró que las hembras de laboratorio se apareaban con mayor frecuencia que las salvajes.

Los resultados de las pruebas bisexuales parecen afirmar la compatibilidad entre moscas salvajes y de laboratorio. Además, en coincidencia con Zapien et al. (1983), en este trabajo se observó que las hembras de laboratorio son menos selectivas que las salvajes.

La mayor agresividad, e intentos de cópula con otros machos observados en la línea T228 se habrían originado por selección sexual como respuesta a las condiciones

particulares de la cría masiva. La consecuencia de estas diferencias comportamentales en condiciones más realistas que las correspondientes al presente experimento no son totalmente predecibles, pero podrían afectar su éxito copulatorio.

Los resultados parecen confirmar compatibilidad entre las líneas pero no son definitivas en cuanto a la competencia en el apareamiento. Las experiencias en jaulas de campo son más informativas para determinar si las diferencias se mantienen en condiciones más similares a las de las poblaciones naturales utilizando hembras y machos salvajes.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION GENERAL

La gran diferencia de estrategias de vida desarrolladas durante la colonización en el campo comparado con el laboratorio, resulta en una divergencia drástica en el comportamiento reproductivo entre moscas de cría masiva y salvajes. En la naturaleza, la diversidad ambiental determina que la interacción entre la selección natural y otros procesos evolutivos tiende a incrementar la diversidad en diversos rasgos, incluyendo caracteres morfométricos y otros relacionados con el ciclo de vida (caracteres bionómicos). El comportamiento sexual se basa en la elección de la hembra luego de que el macho le presenta a ella una serie de intrincadas señales o estímulos visuales, acústicos y físicos (Eberhard 2000). Durante la adaptación a la cría masiva se tiende a acortar cada fase del ciclo y suele reducir la varianza genética y fenotípica. Además, debido al manejo de los criaderos, en cada generación se selecciona para una alta producción de huevos en las hembras jóvenes. El comportamiento sexual en las líneas de laboratorio parece estar caracterizado por un rápido apareamiento, con machos impetuosos y a veces agresivos y hembras menos selectivas. Además, en *C. capitata*, algunas líneas fueron seleccionadas para apareamiento rápido (Harris et al. 1983). Este comportamiento sexual alterado puede darse porque en el laboratorio, las moscas son expuestas a diferentes niveles de señales químicas, visuales y físicas que los experimentados por las moscas salvajes. La inevitable selección de un grupo diferente de atributos comportamentales puede llevar a reducir la efectividad de los insectos de cría masiva en el campo.

Inicialmente, los análisis de propensión al apareamiento se realizaban en el laboratorio, midiendo la competitividad sexual de líneas de cría masiva por su éxito en el apareamiento en pequeñas cajas de plástico (Brazzel et al. 1986). Zapien et al. (1983) y Chambers et al. (1983), utilizaron pruebas en jaulas de campo como un análisis de control de calidad para monitorear la competitividad de una línea de laboratorio de la mosca del Mediterráneo. Los análisis de laboratorio fueron erradicados para determinar el comportamiento de insectos de cría masiva por ser poco representativos del desempeño en condiciones naturales, y el análisis en jaulas de campo se tornó esencial (Cayol et al. 1999). Esto es un paso hacia delante en la evaluación apropiada de la calidad comportamental de las líneas de cría masiva..

El análisis de apareamiento en jaulas de campo no responde todas las preguntas de la calidad comportamental de las moscas de cría masiva. Este análisis puede sólo ser usado para evaluar la calidad relativa de las líneas de cría masiva, pero no puede predecir resultados a campo. El tamaño estándar de las jaulas de campo generalmente aloja un solo árbol adentro. Esto puede no ser representativo de una situación a campo abierto, especialmente en el caso de *C. capitata* que forman leks. Las moscas analizadas son vírgenes y casi siempre de la misma edad. Las mismas moscas son analizadas un solo día y la respuesta al reapareamiento no suele medirse, como tampoco se suele evaluar la fertilidad de los huevos. Los árboles necesitan ser pequeños o podados para facilitar la observación, lo cual puede afecta la respuesta de las moscas a varios estímulos (ej. Intensidad de luz). A pesar de todo esto, las jaulas de campo constituyen el mejor compromiso entre la factibilidad para realizar las observaciones en un medio controlado y las condiciones de campo. Futuras investigaciones podrían mejorar el diseño de las jaulas de campo par poder simular

mejor las condiciones a campo abierto (ej. Incrementando el tamaño de la jaula , guardando las moscas para días consecutivos, liberando moscas de distintas edades, vírgenes y ya apareadas, etc.).

Una observación bastante generalizada que se obtiene de las experiencias en jaulas de campo es que las moscas de cría masiva suelen ser inferiores a las mosca de campo. Esto puede deberse no solo a la cría masiva en sí sino también, en el caso de una LSG, al efecto posible del proceso para inducir mutaciones y traslocaciones. También la calidad de las moscas puede disminuir, dependiendo de la dosis, por la radiación recibida durante la esterilización. Por esta razón es muy importante realizar periódicamente estudios de dosimetría biológica, con el objeto de ajustar las dosis de radiación al mínimo necesario para inducir esterilidad, con un mínimo efecto sobre la capacidad competitiva de las moscas liberadas, asegurando así su calidad. Además, debido al deterioro genético subyacente a la cría masiva, es necesario reemplazar la línea regularmente. Esto es más económico, como acción preventiva, que subsanar a posteriori el fracaso en la aplicación del método.

Considerando el progreso hecho en el conocimiento del comportamiento reproductivo de *C. capitata*, estos estudios sientan las bases y alientan investigaciones con el mismo propósito en otras moscas de la fruta de interés como *A. fraterculus*. Los conocimientos provenientes de la aplicación de las técnicas de videograbación en laboratorio y análisis en jaulas de campo podrán ser luego aplicados para el desarrollo de la cría masiva de esta especie para poder utilizar la TIE en vastas regiones de la Argentina donde se extiende esta plaga junto con *C. capitata*.

A pesar de lo mucho que se ha avanzado, aún quedan muchos interrogantes sobre el comportamiento sexual de *C. capitata* que alientan la continuación de esta línea de investigación, en particular, continúan sin respuestas preguntas sobre el determinante del éxito reproductivo y los mecanismos por los cuales las hembras eligen a los machos, incluyendo el análisis de diferentes tipos de estímulos (olfatorios, visuales, acústicos, etc.).

Como es común en estudios de posible selección sexual por elección de la hembra (Anderson 1994), las interacciones macho-hembra nos confronta con un conjunto de estímulos del macho que sorprendentemente variables en duración, intensidad, secuencia y combinación de estímulos, que pueden posiblemente influenciar en la receptividad de la hembra. Este problema es particularmente crítico en *C. capitata* porque probablemente están involucrados muchos caracteres sensoriales.

Muchas de estas preguntas tiene un potencial significativo para mejorar el éxito de los intentos de control de las poblaciones de *C. capitata* con moscas de cría masiva. El progreso reciente más importante es un estudio en Hawai (Shelly et al. 1994) que centra la atención en el cortejo del macho por sí, mostrando que los machos de cría masiva en el campo participan de los leks y atraen a larga distancia a las hembras como sus pares salvajes.

El video análisis del la respuesta comportamental de la hembra podría dar buena información, sobre todo si se la combinara con el reemplazo experimental de determinados estímulos (Sivinski et al. 1984) y la remoción en el macho de antenas o alas o setas espatuladas (Nakagawa et al. 1973; Sivinski et al. 1984). Otra

aplicación del estudio comportamiento del cortejo puede ser determinar la posible filogenia de las especies del género *Ceratitis* (De Meyer 2000). Esto puede ayudar a determinar cuales caracteres del macho en *C. capitata* son recientemente establecidos y cuales son importantes para la elección de la hembra. Ello sería importante porque podría derivar en posibles diferencias en el comportamiento de hembras y machos de diferentes sitios geográficos, algunas diferencias de este tipo están comenzando a surgir (McInnis 1996).

Podría ser necesario estudiar en más detalle el tipo de selección que ocurre en las jaulas de cría masiva (Cayol, 2000), con el sentido de orientar y focalizar investigaciones para diferenciar el comportamiento del cortejo del macho y receptividad de la hembra de las líneas de cría masiva. Características que son probablemente marcadamente superiores en estas jaulas (cortejos cortos, reducción de la agresión, tal vez montar hembras sin cortejo) podrían divergir rápidamente en las líneas de cría masiva. Por otro lado características que sufren una selección pequeña o no direccional solo podrían derivar en un cambio muy pequeño.

Por lo hasta ahora visto se confirma que la selección en jaulas de cría masiva produce una importante divergencia en *C. capitata*. La edad de reproducción, la duración del cortejo, apareamiento sin cortejo, distancia macho-hembra cuando el cortejo se inicia, inhibición de la receptividad de olores de plantas y la agresión del macho están todos probablemente bajo una selección direccional y todas estas características difieren entre líneas salvajes y de cría masiva (Cayol 2000; Briceño y Eberhard 1998; Wong y Nakahara 1978; Briceño et al. 1998). Las frecuencias de

sonido de "Faning" y "Buzzing" estaban alteradas en los machos de cría masiva, quizás debido a diferencias de tamaño (Sivinski et al. 1989).

Hay también diferencias en la duración de la cópula, pero el significado reproductivo de diferentes duraciones no ha sido aún revelado.

En contraste, la efectividad de la feromona para atraer a la hembra, participación en leks, duración de zumbidos individuales en el "Buzzing", y la hora del día cuando los machos son sexualmente activos todos parecen sufrir una selección menos dura en condiciones de cría masiva, y ellos divergen poco o no lo hacen (Shelly et al. 1994; Wong y Nakahara 1978 y Cayol 2000). Las líneas de cría masiva probablemente representan experimentos evolutivos sobre los efectos de selección con motivo de alteración de las condiciones ambientales.

CONCLUSIONES

- El éxito en el apareamiento en moscas salvajes de *C. capitata* analizado en este trabajo parece estar influenciado por la hora del día, produciéndose el mayor número de apareamientos entre la 10:00 y 14:00 horas. Este también depende de la edad de las moscas, produciéndose el mayor número de apareamientos con moscas salvajes de 11 a 17 días.

- Las observaciones realizadas en este trabajo están de acuerdo con el sistema de apareamiento propuesto para *C. capitata*, que es el sistema de lek polígamo en los machos. Se pudo observar que los machos salvajes y de laboratorio formaban leks mixtos. Por lo tanto, los machos de laboratorio mantienen su capacidad de

formar leks a pesar del alto número de generaciones que llevan en condiciones de laboratorio.

- El mayor número de cópulas se produjo en la cara abaxial de las hojas del árbol y en el tercio medio del árbol en concordancia con los lugares donde los machos forman los leks. Esto se vio tanto para machos salvajes como de laboratorio sin irradiar. En los individuos irradiados este comportamiento se ve algo alterado.

- Las líneas de laboratorio tienden a arribar a la cópula más rápidamente que las salvajes en laboratorio debido a que las condiciones de la cría masiva favorecen un rápido apareamiento con reducción del cortejo.

- Se pudo observar en jaulas de campo que las altas radiaciones afectan el éxito copulatorio. A medida que aumenta la dosis de radiación se observa una disminución en la capacidad de vuelo y de integración a los leks. Estos efectos determinan una marcada reducción de la capacidad para la competencia intrasexual.

- Con el análisis de las videograbaciones se determinó que las altas dosis de rayos X afectan el patrón de comportamiento de cortejo. En los machos se observó una disminución de actividades esenciales del cortejo previas a la cópula (selección intersexual).

- Las altas dosis de rayos gamma parecen no ser tan nocivas como las de rayos X. Se vio que con dosis equivalentes los machos tratados con rayos X mostraban menor capacidad de integrarse a los leks o lo hacían fuera del horario de mayor apareamiento, su habilidad de vuelo estaba más alterada y la proporción de éxito machos fue más baja.

- Se encontraron diferencias significativas en la duración de la cópula entre machos salvajes y de laboratorio irradiados, pero estos resultados no se vieron reflejados en la transferencia de esperma que fue positiva en ambos casos.

- Los resultados indican la necesidad de determinar la dosimetría precisa, para irradiar al material biológico, que permita un compromiso entre la máxima esterilidad y una aptitud copulatoria satisfactoria.

- Los resultados indican que la eficiencia de la línea nueva autosexante (T228), analizada producida en el INTA-Castelar es muy buena, tanto en lo que se refiere compatibilidad en el apareamiento con moscas salvajes como en la competencia intrasexual de los machos de esta línea con los salvajes. Aunque los resultados revelan que el éxito copulatorio en los machos disminuye por efecto de la radiación esto se podría compensar, para no reducir la eficiencia de los programas de control y erradicación de esta plaga, porque la cantidad de machos estériles liberados es 100 veces mayor que el número estimado de la población natural.

- El mejor método para estandarizar el control de calidad de las líneas de cría masiva se basa en los estudios en jaulas de campo, porque además de ser en condiciones más similares a las de las poblaciones naturales, permite un análisis tanto de la compatibilidad entre líneas como de la competencia en el apareamiento, esta última no puede ser analizada en cajas de apareamiento pequeñas donde los machos no pueden formar leks. Sin embargo las líneas utilizadas en la TIE deberían periódicamente ser chequeadas por análisis de videograbaciones, para determinar si las condiciones de cría masiva afectan su patrón de cortejo.

DR. JUAN C. VILARDI

ALCOCK, J. and D.W. PYLE. 1979. The complex courtship behavior of *Physiphora demandata* (F.) (Diptera: Otidae). Z. Tierpsychol. 49: 352-362.

ALCOCK, J. 1994. Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypotesis. Annu. Rev. Entomol. 39: 1-21.

ALUJA, M., HENDRICHS, J. and M. CABRERA. 1983. Behavior and interactions between *Anastrepha ludens* (Loew) and *A. obliqua* (Maquat) on a field caged mango tree. I. Lekking behavior and male territoriality. In Cavaloro, R. (Ed.) Fruit flies of Economic Importance. P. 122-133. A.A. Balkema, Rotterdam.

ANDERSSON, M. 1982. Female choice selects for extreme tail length in a widow-bird. Nature 299: 818-820.

ANDERSSON, M. 1994. Sexual Selection. Princeton University Press, Princeton.

ARITA, L. and KANESHIRO. 1985. The dynamics of the lek system and mating success in males of the Mediterranean fruit fly, Ceratitis capitata (Wiedemann). Proc. Hawaiian Entomol. Soc. 25: 39-48.

ARITA, L. and KANESHIRO. 1986. Structure and function of the rectal epitthelium and anal glands during mating behavior in the mediterranean fruit fly male. Proc. Hawaiian Entomol. Soc. 26: 27-30.

ARITA, L. and KANESHIRO. 1989. Sexual selection and lek behavior in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Pac. Sci. 43:135-143.

ARUANI, R.; CERESA, A; GRANADOS, JC; TARET, G; PERUZZOTTI, P; ORTIZ,G. 1996. Advances in the national fruit fly control and eradication program in Argentina. In: Mc Pheron B.A. & Steck G.J. (Eds) "Fruit fly pests a world assessment of their biology and management". St Lucie Press, Delray Beach, 521-530.

BAKER, P.S. and H. VAN DER VALT .1992. Distribution and behaviour of sterile Mediterranean fruit flies in a host tree. J. Appl. Entomol. 114: 67-76.

BATEMAN, M. 1972. The ecology of fruti flies. Annu. Rev. Entomol. 17: 493-518.

BAUTISTA, R.G. and E. J. HARRIS. 1996. Effect of fruit sustrate on parasitization of tephritid fruit flies (Diptera) by the parasitoid *Biosteres arisanus* (Hymenoptera: Braconidae). Environ. Entomol. 25:470-475.

BLAY, S. and B. YUVAL. 1997. Nutritional correlates to reproductive success of male Mediterranean fruit flies. Anim. Behav. 54: 59-66.

BELL, W.J. 1990. Searching behavior patternsin insects. Annu. Rev. Entomol. 35: 447-467.

BOAKE, C.R.B. 1986. A method for testing adaptative hipótesis of mate choice. Am. Nat. 127: 654-666

BOAKE, C., SHELLY, T., KANESHIRO, K. 1996. Sexual selection in relation to pest-management strategies. Ann. Rev. Entomol 41: 211-229.

BOLLER, E.F. andC.O. CALKINS. 1984. Measuring monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, Ceratitis capitata (Wied.) 3. Improvement of quality by selection. Z. Angew. Entomol. 98: 1-15.

BRADBURY, J.W. 1981. The evolution of leks. In Alexander, R.D. & D.W. Tinkle (Eds.) Natural selection and Social Behavior: Recent Research and New Theory. P. 138-169. Chiron press, NY.

BRADBURY, J.W. and R.M. GIBSON. 1983. Leks and male choice. In Batenson, P. (Ed.). mate Choice. Cambridge University Press. p. 109-140.

BRAZZEL, J. R.; CALKINS, C.; CHAMBERS, D. L.; GATES, D. B. 1986. Required quality control tests, quality specifications, and shipping procedures for laboratory produced Mediterranean fruit flies for sterile insect control Programs. USDA manual, APHIS 81-51: 28p.

BRICEÑO, R.D. and W.G. EBERHARD. 1998. Medfly courtship duration: a sexually selected reaction norm changed by crowding. Ethol. Ecol. Evol. 10: 369-382.

BRICEÑO, R.D., D. RAMOS, and W.G. EBERHARD. 1998. Aggressive behavior in medflies (*Ceratitis capitata*) and the effects of mass-rearing (Diptera: Tephritidae). J. Kans. Entomol. Soc. 72: 17-27.

BRICEÑO, R.D. and W.G. EBERHARD. 2000. Possible Fisherian changes in female mate-choice criteria in a mass-reared strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 93: 343-345.

BURK, T. 1981. Signaling and sex in acalyptrate flies. Fla. Entomol. 64: 30-43.

BURK, T. 1983. Behavioral ecology of mating in the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Fla. Entom. 66: 330-344.

BURK, T. and C.O. CALKING. 1983. Medfly mating behavior and control strategies. Fla. Entomol. 66: 3-18.

BURK, T. and J.C. WEBB. 1983. Effect of male size on calling propensity, song parameters, and mating success in Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Ann. Ent. Soc. Am. 76: 678-682.

BURK, T. 1991. Sex in leks: an overview of sexual behavior in Anastrepha fruit flies. En Kawasaki, K.; Iwahashi, O. y Kaneshiro, K.Y. (Eds.). Proceedings of The International Symposium on The biology and control of fruit flies. 171-183.

BUSH, G.L, NECK, R.W. and G.B. VITTO. 1976. Screwworm eradication: Inadvertent selection for noncompetitive ecotype during mass-rering. Science 212: 563-575.

CACERES, C., FISHER, K., and RENDON, P. 1999. En proceedings of "FAO/IAEA Internacional Conference on Area-Wide Control of Insect Pests Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques.

CALCAGNO, G.; VERA, M.; MANSO, F.; LUX, S.; NORRY, F.; MUNYIRI, N. AND VILARDI, J.C. 1999. Courtship behavior of wild and mass-rearing Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) males from Argentina. J.Econ. Entomol. 92(2): 373-379.

CALKINS, C. O. 1984. The importance of understanding fruit fly mating behavior in sterile male release programs (Diptera: Tephritidae). Folia Ent. Mex. 61: 205-213.

CALKINS, C. O. 1989a. Quality control. En: Fruit flies, their biology, natural enemies and control. Robinson, A. S. and Hooper, G. (Ed.). Amsterdam.

CALKINS, C. O. 1989b. Lekking behaviour in fruit flies and its implications for quality assessments. In fruit flies of Economic Importance 87 (R. Cavalloro, ed.), pp. 135-139. A.A. Balkema, Rotterdam.

CAMACHO, H. 1989. Transferencia de espermatozoides en la mosca del Mediterráneo Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae). Master's thesis, Universidad de Costa Rica.

CAPY, P., and D. LACHAISE. 1986. The role of assortative mating among age-classes in Drosophila melanogaster: Preliminary results. Experientia 42: 1051-1053.

CAREY, J.R., D. A. KRAINACKER and R.I. VARGAS. 1986. Life history response of female Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata*, to periods of host deprivation. Entomol. Exp. Appl. 42: 159-167.

CAREY, J.R., P. LIEDO, D. OROZCO, and J. W. VAUPEL. 1992. Slowing of mortality rates at older ages in larger medfly cohorts. Science 281: 996-998.

CAREY, J.R., P. LIEDO, H. MULLER, J. WANG, and J. VAUPEL. 1998. Dual modes of aging in Mediterranean fruit flies females. Science 281: 996-998.

CAUSSE, R. and M. FERON. 1967. Influence du rythme photoperiodique sur l'activite sexuelle de la mouche Mediterranee des fruits: *Ceratitis capitata* Weidemann (Diptere Trypetidae). Ann. Epiphyt. 18: 175-192.

CAYOL, J.P. 1996. Box thorn, key early season host of the Mediterranean fuit fly. Int. J.Pest. Manage. 42: 325-329.

CAYOL, J.P., J. VILARDI, E. RIAL, and M.T. VERA. 1999. New indices to measure the sexual compatibility and mating performance of medfly (Diptera: Tephritidae) laboratory reared strains under field cage conditions. J. Econ. Entomol. 92: 140-145.

CAYOL, J.P. 2000. Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species aused by mass-rearing proceses. En M. Aluja and A.L. Norrbom (Eds.) Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior, pp 843-860. USA.

CHAMBERS, D. 1977. Atractans for fruit fly survey and control. In Shorey h.h. & j.j. McKelvey Jr. (Eds.) Chemical control of Insect Behavior: Theory and Application. P. 327-344. John Wiley & Sons, NY.

CHAMBERS, D., CALKINS, C., BOLLER, E., ITÖ, Y., CUNNINGHAM, R. 1983. Measuring, monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Wied). Z. Ang. Ent. 95: 285-303.

CHRISTENSON, L.D. y R.H. FOOTE. 1960. Biology of Fruit Flies Ann. Rev. Entomology. 5: 171-192

CHURCHILL-STANLAND, C.; STANLAND, R.; WONG, T. T. I.; TANAKA, N.; McINNIS, D. O. and DOWELL, R. V. 1986. Size as a factor in the mating

propensity of Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), in the laboratory. J. Econ. Entomol. 79: 614-619. -

CLADERA, J. L. 1981. Absence of recombination in the male of *Ceratitis capitata* Experientia, 37, 342.

CLADERA, J.L. 1995. Self sexing strain of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) based on a gene that afects the rate of development. Ann. Entomol. Soc. Am. 88: 353-356

COX, C.R. and B.J. LE BOEUF. 1977. Female incitation of male competition: Amechanism of mate selection. The Amerian Naturalist 111: 317-335.

CRONIN, E.W. Jr. and P.W. SHERNAN. 1976. A resourse-based mating system: The orange –rumped honeyguide. Living bird. 15: 5-32.

DAL-MOLIN, C. 1978. An external scent as the basis for a rare-male mating advantage in *Drosophila melanogaster*. Am. Nat. 113: 951-954.

DARWIN, C.R. 1871. The descent of man and selection in relation to sex. John Murray, Londres.

DEBOUZIE, D. 1989. Biotic mortality factors in Tephritid populations. En Robinson, A.S. y Hooper, G. (eds.) Fruit Flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, 3 (B), pp. 221-227, Elsevier, Amsterdam.

DELONGO, O., COLOMBO, A., GOMEZ-RIERA, P. 1999. En proceedings of "FAO/IAEA Internacional Conference on Area-Wide Control of Insect Pests Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques.

DE MEYER, M. 2000. Phylogeny of the Genus Ceratitis (Dacinae: Ceratitidini). En M. Aluja and A.L. Norrbom (Eds.) Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior, pp. 409-428. USA.

DODSON, G.N. 1982. Mating and teritoriality in wild *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in field cages. J. Georgia Ent. Soc. 17: 189-200.

DREW, R.A.I. 1989. Taxonomic characters used in identifying Tephritidae. En Robinson, A.S. y Hooper, G. (eds.) Fruit Flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, 3 (A), 9-14, Elsevier, Amsterdam.

DRIDI, B. 1990. Etude de quelques aspects de la biologie de la mouche Méditerranéenne des fruits: *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptére,

Trypetidae). Différenciation entre souche d'elevage et population sauvage provenant d'Algérie. Ph.D. thesis, Université Aix-Marseille 3, Marseille.

EBERHARD, W. 1991. Copulatory courtship and cryptic female choice in insect. Biol. Rev. 66: 1-31.

EBERHARD, W. 1994. Evidense for widespread coutship during copulation in 131 species of insects and spiders, and implications for cryptic female choice. Evolution 48: 711-733.

EBERHARD, W. and R.D. BRICEÑO. 1996. Genetic assimilation of the effects of crowding on the duration of premounting courtship behaviour of male medflies (Diptera: Tephritidae). In Medfly Mating Behaviour Studies under Field Cage Conditions: Peport of the second Research Co-ordination Meeting. International Atomic Energy Agency, Vienna. 53pp.

EBERHARD, W. 2000. Sexual behavior and sexual selection in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Dacinae: Ceratitidini). En M. Aluja and A.L. Norrbom (Eds.) Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior, pp 459-489. USA.

EMLEN,S. T. and ORING, L. W. 1977. Ecology, sexual selection and evolution de mating systems. Science 179: 215-223.

FARRIAS, G.T., R.T. CUNNINGHAM, and S. NAKAGAWA. 1972. Reproduction in the Mediterranean fruit fly: abundance of stored sperm affected by duration of copulation and affecting egg hatch. J. Econ Entomol. 65: 914-915.

FAVRET, E.; LIFSCHITZ, E. y MANSO, F. 1995. Esterilización de líneas autosexantes en la plaga de los frutales Ceratitis capitata. Wied. (Mosca del Mediterráneo). Mendeliana 11: 69-83.

FERON, M. 1962. L' Instinct de reproduction chez la mouche Mediterranéenne des fruits Ceratitis capitata Wied (Dipt. Trypetidae). Comportement sexuel-comportement de ponte. Rev. Pathol. Veg. Entomol. Agric. Fr. 41: 1-129.

FERON, M. & M. SERMENTE. 1963. Différentiation sexuelle aux stades oeuf et pupe chez la mouche Méditerranéene des fruits *Ceratitis capitata* Wied., Revue Path. vég. Ent. Agric. Fr. 42: 239-244.

FERON, M. 1966. Stérilisation de la mouche mediterranéene de fruits. *Ceratitis capitata* Wied., par irradiation des pupes aux rayons gamma, Annis Epiphyt. 17: 229-239.

FIELD, S.A. and B YUVAL. 1999. Nutritional status affects copula duration in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Insecta: Tephritidae). Ethol. Ecol. Evol. 11: 61-70.

FIELD, S.A., KASPI, R., and YUVAL, B. Why do calling Medflies cluster? Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution. Florida Entomol. (En prensa)

FIELD, S.A., P.W. TAYLOR, and YUVAL, B. Sources of variability in copula duration of Mediterranean fruit flies. Entomol. Exp. Appl. (En prensa)

FIMIANI, P. 1989. Mediterranean Region. En Robinson, A.S. y Hooper, G. (eds.) Fruit Flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, 3 (A), 39-50, Elsevier, Amsterdam.

FISHER, R.A. 1930. The genetical theory of natural selection. 1958. (2° ed.). Dover. Nueva York.

FISHER, K. and CACERES, C. 1999. En proceedings of "FAO/IAEA Internacional Conference on Area-Wide Control of Insect Pests Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques.

FLITTERS, N.E. 1964. The effect of photoperiod, light intensity and temperature on copulation, oviposition , and fertility of the Mexican fruit fly. J. Econ. Entomol. 57: 811-813.

FRANZ, G., KERREMANS, Ph. 1993. Radiation induced chromosome aberrations for the genetic analysis and manipulation of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Pp. 187-194 en: Proceedings of the International Symposium on Management of Insect Pest: Nuclear and related Molecular and Genetic Techniques, Vienna,19-23 October 1992.

FRANZ, G., KERREMANS, Ph., RENDON, P., and HENDRICHS, J. 1996. Development and application of genetic sexing systems for the Mediterranean fruit fly based on temperature sensitive lethal. En "Fruit Fly Pests: A World Assessment of their Biology and Management" Eds B. A. McPheron and G. J. Steck, St. Lucie Press. 185-191.

GALUN, R., S. GOTHILF, S. BLONDHEIM, J.L. SHARP, M. MAZOR, and A. LACHMAN. 1985. Comparison of aggregation and feeding responses by normal and irradiated fruit flies, *Ceratitis capitata* and *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). Environ. Entomol. 14: 726-732.

GILMORE, J.E. 1989. SIT: Overview. En Robinson, A.S. y Hooper, G. (eds.) Fruit Flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, 3 (B), pp. 353-362, Elsevier, Amsterdam.

GREATHEAD, D. J. 1972. Notes on coffee fruit-flies and their parasites at Kawanda (Uganda). Tech. Bull. Comm. Inst. Biol. Control 15: 11-18.

HAISH, A. 1969. Some observation on decreased vitality of irradiated Mediterranean fruit fly. Proceeding of a panel on Sterile male Technique for control of fruit flies, Vienna, Austria, pp 71-75.

HALLIDAY, T.R. 1983. The study of mate choice. In Batenson, P. (Ed.) Mate Choice. p. 3-32. Cambridge University Press.

HANCOCK, D. L. 1984. Ceratitinae (Diptera: Tephritidae) from the Malagasy subregion. J. Entomol. Soc. South. Afr. 47: 277-301.

HARRIS, D. J., WOOD R. J., BAILEY S. E. R. 1983. Studies on mating in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. In Fruit Flies of Economic Importance (R. Cavalloro, ed.), pp. 197-202. A.A. Balkema, Rotterdam.

HARRIS, D. J., WOOD R. J., BAILEY S. E. R. 1986. Selection for fast and slow mating lines in the medfly and analisis of elements of courtship behaviour. En Mangel, M., ed. Pest control: operations and systems análisis in fruti fly management. Berlin, Springer-Verlag.

HEADRICK, D. H. and R. D. GOEDEN. 1994. Reproductive behavior of California fruit flies and the classification and evolution of Tephritidae (Diptera) mating systems. Stud. Dipterol. 1: 194-252

HEADRICK, D. H. and R. D. GOEDEN. 1996. Issues concerning the eradication or establishment and biological control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), in California. Biol. Control 6: 412-421.

HEATH, R.R., N.D. EPSKY, D.B. DUEBEH, A. GUZMAN, and L.E. ANDRADE. 1994. Gamma radiation effests on production of four pheromonal

components of male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 87: 904-909.

HENDRICHS, J., and HENDRICHS, M. 1990. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in nature: Location and diel pattern of feeding and other activities on fruiting and nonfruiting hosts and nonhosts. Ann. Entomol. Soc. Am. 83(3): 632-641.

HENDRICHS, J., B.I. KATSOYANNOS, D.R. PAPAJ, and R.J. PROKOPY. 1991. Sex differences in movement between natural feeding and mating sites and tradeoffs between food consumption, mating success and predator evasion in Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). Oecologia 86: 223-231.

HENDRICHS, J. 1986. Sexual selection in wild and sterile Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera Tephritidae). M. Sc. Thesis. University of Florida. 243pp.

HENDRICHS, J., B. KATSOYANNOS, K. GAGGL, V. WORNOAYPORN, and M.A. HENDRICHS. 1994. Odour-mediated foraging by yellowjacket wasp (Hymenoptera: Vespidae): predation on leks of pheromona-calling Mediterranean fruit fly males (Diptera: Tephritidae). Oecologia 99: 88-94.

HENDRICHS, J., FRANZ, AND P. RENDON. 1995. Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. J. Appl. Entomol. 119: 371-377.

HENDRICHS, J., B. KATSOYANNOS, K. GAGGL, and V. WORNOAYPORN. 1996. Competitive behavior of males of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, genetic sexing strain Vienna-42. En Fruit Fly Pests: A World Assessment of Their Biology and Management (B. A. McPheron and G.j. Steck, eds.), pp. 405-414. St. Lucie Press, Delray Beach.

HIBINO, Y. and O. IWAHASHI. 1991. Appearance of wild females unreceptive to sterilized males on Okinawa Is. In the eradication program of yhe melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae). Appl. Entomol. Zool. 26: 265-270.

HOGLUNG, J. and R.V. ATALANO. 1995. Leks. Princeton University Press, Princeton.

HOLBROOK, F.R., L.F. STEINER, and M.S. FUJIMOTO. 1970. Mating competitiveness of Mediterranean fruit flies marked with fluorescent powders. J. Econ. Entomol. 63: 454-455.

HOOPER, G., HORTON, I. 1981. Competitiveness of sterilized male insects: A method of calculating the variance of the value derived from competitive mating tests. J. Econ Entomol. 74: 119-121.

ITO, Y. and H. KAKINOKANA. 1995. Eradication of the melon fly (Diptera: Tephritidae from the Ryukyu Archipelago with the sterile insect technique: possible reasons for its success. In The Mediterranean Fruit Fly in California: Defining Critical Research (J.G. Morse. R.L. Metcalf, J.R. Carey, and R.V. Dawell, eds.), pp. 215-229. University of California, Riverside.

IWAHASHI, O., Y. ITO, and SHIYOMI. 1983. A field evaluation of the sexual competitiveness of sterile melon flies, *Dacus (Zeugodacus) cucurbitae.* Ecol. Entomol. 8: 43-48.

IWAHASHI, O., and T. MAJIMA. 1986. Lek formation and male-male competition in the melon fly *Dacus cucurbitae* Coquillet (Diptera: Thephritidae). Appl. Entomol. Zool.21: 70-75.

JANG, E.B. 1995. Effect of mating and accessory gland injections on olfactory mediated behavior in the female Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata.* J. Insect Physiol. 41:705-710.

JANG, E.B. D.O. McINNIS, D.R. LANCE, and L.A. CAVALHO. 1998. Mating-induced changes in olfactory-mediated behavior of laboratory-reared normal, sterile and wild female Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) mated to conspecific males. Ann. Entomol. Soc. Am. 91: 139-144.

KASPI, R. and B. YUVAL. 1999a. Lek site selection by male Mediterranean fruit flies. J. Insect Behavi. 12: 267-276.

KASPI, R. and B. YUVAL. 1999b. Mediterranean fruit fly leks: factors affecting male location. Funct. Ecol. 13: 539-545

KATIYAR, K.P. 1962. Possibilities of eradication of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied., from Central America by gamma irradiated males.

Vol.2, p. 211-217. En 4th. Inter-American Symposium on the peaceful application of Nuclear Energy, Washington, D.C, Pan American Union.

KAZIMIROVA, M. and V. VALLO. 1992. Influence of larval density of Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*, Diptera, Tephritidae) on parasitization by a pupal parasitoid, *Coptera occidentalis* (Hymenoptera, Proctotrupoidea, Diapriidae) Acta Entomol. Bohemoslov. 89: 179-185.

KEISER, I., R.M. KOBAYASHI, D.L. CHAMBERS and E.L. SCHNEIDER. 1973. Relation the sexual dimorphism in the wings, potential stridulation, and ilumination to mating of oriental fruit fly, melon flies, and Mediterranean fruit fly in Hawaii. Ann. Entomol. Soc. Am. 66: 937-941.

KIRKPATRICK, M. 1987. Sexual selection by female choice in polygynous animals. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 43-70

KNIPLING, E.F. 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually selected sterile males. Journal of Economic Entomology 48: 459-462.

KNIPLING, E.F. 1979. The basic principles of insect suppression and management. U.S. Dept. Agric. Handbook 512. U.S. Government Printing Office, Washington, D. C.

KOYAMA, J., H. NAKAMORI, and H. KUBA.1986. Mating behavior of wild and mass-reared strains of melon fly *Dacus cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae) in a field cage. Appl. Entomol. Zool. 21: 203-209.

KUBA, H., J. KOYAMA, and R.J. PROKOPY. 1984. Mating behavior of wild melon flies, *Dacus cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae) in a fiel cage: Distribution and behavior of flies. Appl. Ent. Zool. 19: 367-373.

KUBA, H., J. KOYAMA. 1985. Mating behavior of wild melon flies, *Dacus cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae) in a fiel cage: Courtship behavior. Appl. Ent. Zool. 20: 365-372.

LANCE, D.R. and D.O. McINNIS. 1993. Misrepresented reality? Am. Entomol. 39:196

LANDONT, P.J., R.R. HEATH, and D.L. CHAMBERS. 1992. Oriented flight responses of female Mediterranean fruit flies to calling males, odor of calling males, and a synthetic pheromone blend. Entomol. Exp. Appl. 65: 259-266.

LAWRENCE, P.O. 1981. Host vibration – a cue to host location by the parasite *Biosteres longicaudatus*. Oecología 48: 249-251.

LE BOEUF, B.J. 1974.Male-male competition and reproductive success in elephant seals. American Zoologist 14: 163-176.

LEPPLA, N., HUETTEL, M., CHAMBERS, D., ASHLEY, T., MIYASHITA, D., WONG, T., HARRIS, E. 1983. Strategies for colonization and maintenance of the Mediterranean Fruit Fly. Ent. Exp appl. 33: 89-96.

LIEDO FERNANDEZ, P. 1997. Comportamiento Sexual de las moscas de la fruta y sus implicancias para la técnica del insecto estéril. Curso regional sobre moscas de la fruta y su control en áreas grandes, con énfasis en la Técnica del Insecto Estéril. IAEA, México. Pp: 67-78

LIIMATAINEN, J.; HOIKKALA, A.; and SHELLY, T.1997. Courtship behavior in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Comparison of wild and mass-reared males. Ann. Entomol. Soc. Am. 90(6): 836-843.

LINARES, F. y VALENZUELA, R. 1993. Medfly Program in Guatemala and México: Current situation. En fruit flies: Biology and management (ed. M. Aluja and P. Liedo), p 177-179. New york: Springer-Verlag.

LUX, S.A., J. VILARDI, and F. MUNYIRI. 1997. Comparison between two Argentinean strains of medfly: the mass reared in Mendoza and wild ones from Patagonia. In Medfly Mating Behaviour Studies under Field Cage Conditions: Peport of the Third Research Co-ordination Meeting. International Atomic Energy Agency, Vienna. 34pp.

LUX, S.A., J.C. VILARDI, P. LIEDO, K. GAGGL, G. CALCAGNO, F.N. MUNYIRI, M.T. VERA and F. MANSO. 1999. The effects of irradiation on courtship behaviour of medfly, *Ceratitis capitata*, mass reared for Sterile Insect Technique.(Enviado a Florida Entomology)

MADDISON, P.A. y B.J. BARTLETT. 1989. Contribution towards the Zoogeography of the Tephritidae. En: Fruit flies, their biology, natural enemies and control 3A. Robinson, A. S. and Hooper, G. (Ed.). Amsterdam. pp:27-35

MAITLAND, D.P. 1992. Locomotion by jumping in the Mediterranean fruit-fly larva *Ceratitis capitata*. Nature 355:159-161.

MALAVASI, A., MORGANTE, J.S. and PROKOPY, R.J. 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and nonhost trees. Ann. Entomol. Soc. Am. 76: 286-292.

MANGEL, M., PLANT, R.E. y Carey, J:R. 1984. Rapid delimiting of pest infestation: a case study of the Mediterranean fruti fly. Journal of Applied Ecology, 21: 563-579.

MANSO F. y E. LIFSCHITZ. 1992. Nueva metodología genética para el mejoramiento de la eficiencia de la "Técnica del macho estéril" en el control de la Mosca del Mediterráneo *Ceratitis capitata*. Ciencia e Investigación 4: 225-228.

MARKOW, T.A., M. QUAID, and S. KERR. 1978. Male mating experience and competitive courtship success in *Drosophila melanogaster*. Nature 276: 821-822.

MCDONALD, P. 1987 Intragroup stimulation of pheromone-release by male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 80: 17-20.

MCINNIS, D. O., P. T. MCDONALD and S.Y.T. TAM. 1985. Mating efficiencies of variable sex-ratio, sterilized population of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. Ann. Entomol. Soc. Am. 78: 831-835.

MCINNIS, D. O. 1993. Size differences between normal and irradiated sperm heads in mated female Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 86: 305-308.

MCINNIS, D.O.; LANCE, D.R. y JACKSON, C.G. 1996. Behavioral resistance to the Sterile Insect Technique by Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Annals of the Entomological Society of America. 89: 739-744.

MITCHELL, W. C. and SAUL, S. H. 1990. Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, and their application in the USA. Review of Agricultural Entomology 78: 923-940.

MOLLER, A.P. 1994. Sexual selection and the barn swallow. Ed. R.M. May and P.h. Harvey. Oxford.

MORENO, D.S. M. SÁNCHEZ, D.C. ROBACKER, and J. WORLEY. 1991. Mating competitiveness of irradiated Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 84: 1227-1234

MORGANTE, J.S., A. MALAVASI, and R.J. PROKOPY. 1983. Mating behavior of wild *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) on a caged host tree. Fla. Entom. 66: 234-240

MYBURGH, A. 1962. Mating habits of the fruit flies *Ceratitis capitata* (Wied.) and *Pterandrus rosa* (Ksh.). S. Afr. J. Agric. Sci. 5: 457-464.

NAKAGAWA, S., FARIAS, G., SUDA, D., CUNNINGHAM, R., CHAMBERS, D. 1971. Reproduction of the Mediterranean fruit fly: Frequency of mating in the laboratory. Ann.Entomol. Soc Am. 64(4): 949-950.

NAKAGAWA, S., FARIAS, G., SUDA, D., and D.L. CHAMBERS. 1973. Mating behavior of the Mediterranean fruit fly following excision of the antennae. Ann. Entomol. Soc. Am. 66: 583-584.

NAKAMORI, H. 1987. Variation of reproductive characters in wild and mass-reared melon flies, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). Appl. Entomol. Zool. 31: 309-314.

NATION, J.L. 1981. Sex-specific glands in tephritid fruit flies of the genera *Anastrepha, Ceratitis, Dacus, and Rhagoletis* (Diptera Tephritidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol. 10: 121-129.

NUÑEZ- BUENO, L. 1987. La Mosca del Mediterráneo. ICA Informa. En.Feb.Mar/87: 9-14.

OCHIENG-ODERO, J.P.R. 1994. Does adaptation ocurr in insect rearing systems, or it a case of selection, acclimatization and domestication? Insect Sci. Appl. 15: 1-7.

OVRUSKI, S.M. 1994. Comportamiento en la detección del huésped de *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Eucoilidae), parasitoide de larvas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 53: 121-127.

OVRUSKI, S.M. 1995. Pupal and larval-pupal parasitoids (Hymenoptera) obtained from *Anastrepha* spp. and *Ceratitis capitata* (Dipt.: Tephritidae) pupae collected in four localities of Tucuman Province, Argentina. Entomophaga 40: 367-370.

OVRUSKI, S., SCHLISERMAN, P. y P. FIDALGO. 1999. Relevamiento de parasitoides (Hymenoptera) de moscas de la fruta (Diptera. Tephritidae) en la provincia de Tucumán. Actas Taller Internacional sobre Programas de control y erradicación de moscas de los frutos (PROCEM). Buenos Aires.

PARKER, G.A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Biol. Rev. 45: 525-567.

PARTRIDGE, L. 1980. Mate choice increases a component of offspring fitness in fruit flies. Nature 283.

PARTRIDGE, L. and M. HALLIDAY. 1984. Mating paterns and mate choice. In J.R. Krebs and N.B. Davies (eds.), Behavioral Ecology: An Evolutionary Aproach. 2nd. Edn. Blackwell, Oxford, England, pp. 222-250.

PARTRIDGE, L., A. HOFFMANN, and J.S. JONES. 1987a. Male size and mating success in *Drosophila melanogaster* and *D. pseudoobscura* under field conditions. Anim. Behav. 35: 468-476.

PARTRIDGE, L., A. EWING, and A. CHANDLER. 1987b. Male size and mating success in *Drosophila melanogaster*: The roles of male and female behavior. Anim. Behav. 35: 555-562

PERDOMO, A.J., J.L. NATION, and R.M. BARANOWSKI. 1976. Attraction of female and male Caibbean fruit flies to food- baited and male-baited traps under field conditions. Envirom. Entom. 5: 1208-1210.

PEREIRA, R., BARBOSA, A., SILVA, N., CALDEIRA, J., DANTAS, L., and PACHECO, J. 1999. En proceedings of "FAO/IAEA Internacional Conference on Area-Wide Control of Insect Pests Integrating the Sterile Insect and Related Nuclear and Other Techniques.

PICOLLO, M.I., WOOD, E., de LICASTRO, S.A. y E. ZERBA. 1994. Control químico y resistencia a insecticidas. En: La mosca Mediterránea. Quesada Allué, L. A. (Ed.). Bs. As. Argentina.

PROKOPY, R. and HENDRICHS. 1979. Mating behavior of *Ceratitis capitata* on a field-caged host tree. Ann. Entomol. Soc. Am. 72: 642-648.

PROKOPY, R. 1980. Mating behavior in frugivorous tephritidae in nature. In Proc. Symp. on Fruit Fly Problems. Kyoto and Naha, Japan. Natl. Inst. Agric. Science, Japan. P.37-46.

PROKOPY, R., ROITBERG, B. 1984. Foraging behavior of true fruit flies. American Scientist 72: 41-49.

PROKOPY, R., D.R. PAPAJ, S.B. OPP, and T.T.Y. WONG. 1987. Intra-tree foraging behavior of *Ceratitis capitata* flies in relation to host fruit density and quality. Entomol. Exp. Appl. 45: 251-258.

PROKOPY, R. J., S.S. RESILVA, and R.I. VARGAS. 1996. Post-alighting behavior of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) on odor-baited traps. Fla. Entomol. 79: 422-428.

QUESADA-ALLUE, L. A.; RABOSSI, A.; WAPPNER, P. 1994. Introducción a *Ceratitis* y cría en el Laboratorio. En: La mosca Mediterránea. Quesada Allué, L. A. (Ed.). Bs. As. Argentina.

QUILICI, S. And A. FRANCK. 1997. Field cage estudies on mating behavior of *Ceratitis spp.* (Diptera: Tephritidae) in Reunion Islands. 3rd FAO/IAEA Research Coordination meeting on Medfly Mating Behavior Studies Under Field Cage Conditions. Tel Aviv, Israel. 11pp.

RABOSSI, A.; QUESADA-ALLUE, L. A. y WAPPNER, P. 1994. Desarrollo de *Ceratitis*. En: La mosca Mediterránea. Quesada Allué, L. A. (Ed.). Bs. As. Argentina.

RADU, M., ROSSLER, Y., and KOLTIN, Y. 1975. The chromosomes of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied.): Karyotype and chromosomal organization. Cytología, 40: 823-828.

RAUBERHAIMER, D. and S.J. SIMPSON. 1995.Constructing nutrient budgets. Entomol. Exp. Appl. 77: 99-104.

RIVNAY, E. 1950. The Mediterranean fruit fly in Israel. Bull. Entomol. Res. 31: 321-341.

ROAN, C.C., N.E. FLITTERS, C.J. DAVIS. 1954. Light intensity and temperature as factors limityng the mating of Oriental fruit fly. Ann. Entomol. Soc. Am. 47: 593-594.

ROBINSON, A.S., FRANZ,G., and FISHER, K. 1999. Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: Development, mass rearing and field application.

ROITBERG, B.D. 1985. Searchs dinamics in fruit-parasitic insects. J. Insect Physiol. 31: 865-872.

ROLLI, V.K. 1976. Die akustischen sexualsignale von *Ceratitis capitata* Wied. Und *Dacus oleae* Gmel. Z. Angew. Entomol. 81: 219-223.

ROSSLER, Y. 1975. Reproductive differences between laboratory-reared and field-collected populations of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Ann. Entomol. Soc. Am. 68(6): 987-991.

ROSSLER, Y., and KOLTIN,Y. 1976. The genetic of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: three morphological mutations. Ann. Entomol. Soc. Am., 69:604-608.

ROSSLER, Y. 1979a. The genetics of the Mediterranean fruit fly: a "White pupae" mutant. Ann. Entomol. Soc. Am., 75: 583-585.

ROSSLER, Y. 1979b. Automated sexing of *Ceratitis capitata* (Dip: Tephritidae): the development of strains with inherited sex-limited pupal color dimorphism. Entomophaga, 24: 411-416.

ROSSLER, Y. 1980. Sexual competitiveness of males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (W.) (Diptera: Tephritidae); carrying a Y-chromosome translocation. Bull. Entomol. Res. 70: 649-656.

ROSSLER, Y. 1982. Genetic recombination in males of the Mediterranean fruit fly, and its relation to automated sexing methods. Entomol. Soc. Am., 75: 28-31.

SAUL, S.H., S.Y.T. TAM, and D.O. McINNIS. 1988. Relationship between sperm competition and copulation duration in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 81: 498-502.

SEARCY, W.A. 1982. The evolutionary effects of mate selection. Annual Review of Ecology and Systematics 13: 57-85.

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 1997. Libro de resúmenes del "Primer taller sobre avances en investigación y apoyo científico al Programa Nacional de Control y Erradicación de moscas de los frutos en Argentina (PROCEM)". Buenos Aires, 27 al 29 de mayo de 1997.

SENESA. 1999. Actas Taller Internacional sobre Programas de control y erradicación de moscas de los frutos (PROCEM). Buenos Aires.

SEO, S T; VARGAS, R Y; GILMORE, J E; KURASHIMA, R S; AND FUJIMOTO, M S. 1990. Sperm transfer in normal and gamma-irradiated, laboratory-reared

Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). J. Econ Entomol. 83: 1949-1953.

SEOMORI, H., S. TSUKAGUCHI, and H. NAKAMORI. 1980. Comparison of mating competitiveness between mass-reared and wild strains of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae). Appl. Entomol. Zool. 24: 246-250.

SHELLY, T.E. 1996. Courtship in the Mediterranean fruit fly- a comparison of wild and sterile males. In Medfly Mating Behaviour Studies under Field Cage Conditions: Peport of the second Research Co-ordination Meeting. International Atomic Energy Agency, Vienna. 53.

SHELLY, T.E., T.S. WHITTIER and K.Y. KANESHIRO. 1994. Sterile insect release and the natural mating system of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 87: 470-481.

SHELLY, T.E. and T.S. WHITTIER. 1995. Lek distribution in the Mediterranean fruit fly: influence of tree size, foliage density and neighborhood. Proc. Hawaii. Entomol. Soc. 32: 113-121.

SHELLY, T.E. and T.S. WHITTIER. 1996. Mating competitiveness of sterile male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in male only releases. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 754-758.

SHELLY, T.E. and T.S. WHITTIER. 1997. Lek behavior of insects. En Mating Systems in Insects and Arachnids (J.C. Choe and B.J. Crespi, eds.), pp. 273-293. Cambridge University Press, Cambridge.

SHOUKRY, A. and M. HAFEZ. 1979. Studies on the biology of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Ent. Exp. et Appl. 26: 33-39.

SIVINSKI, J. 1980. Sexual selection and insect sperm. Fla. Entomol. 63: 99-111.

SIVINSKI, J. 1984. Effect of sexual experience on male mating success in a lek forming tephritid *Anastrepha suspensa* (Loew). Fla. Entomol. 67: 126-130.

SIVINSKI, J., T. BURK, and J.C. WEBB. 1984. Acoustic courtship signals in the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa* (Loew). Anim. Behav. 32: 1011-1016.

SIVINSKI, J., and J.C. WEBB. 1985. Sound production and reception in the caribfly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Fla. Entom. 68: 273-278.

SIVINSKI, J., and J.C. WEBB. 1986. Changes in a Caribbean fruit fly acoustic signal whith social situation (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 79:146-149

SIVINSKI, J., and T. BURK. 1989. Reproductive and mating behavior. En: Fruit flies, their biology, natural enemies and control 3A. Robinson, A. S. and Hooper, G. (Ed.). Amsterdam. pp:343-352.

SIVINSKI, J., C.O. CALKINS, and J.C. WEBB. 1989. Comparisons of acoustic courtship signals in wild and laboratory reared Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. Fla. Entomol. 72: 212-214.

SIVINSKI, J., M. ALUJA, G. DODSON, A. FREIBERG, D. HEADRICK, K. KANESHIRO, and P. LANDOLT. 2000. Topics in the evolution of sexual behavior in the Tephritidae. En M. Aluja and A.L. Norrbom (Eds.) Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior, pp 751-792. USA.

SMITH, P.H. 1979. Genetic manipulation of the circadian clock's timing of sexual behaviour in the Queensland fruit flies, *Dacus tryoni* and *Dacus neohumeralis*. Physiological Entomology, 4: 71-78.

SMITH, P.H. 1989. Behavioral partitioning of the day and circadian rhythmicity. En Robinson, A.S. y Hooper, G. (eds.) Fruit Flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, 3 (A), pp. 325-341. Elsevier, Amsterdam.

SPIES, E.1982. Do fameles flies choose their mates? Am. Nat. 119: 675-693.

STARK, J.D., VARGAS, R.I. and R.K. THALMAN.1990. "Azadirachtin: effects on metamorphosis, longevity and reproduction of three tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 83: 2166-2174.

STATSOFT. 1996. Statistica 5 for Windows (Computer program manual). Statsoft, Tulsa, O.K.

STEARNS, S.C. 1989. Trade-offs in life-history evolution. Funct. Ecol. 3: 259-268.

TAYLOR, P.W. and B. YUVAL. 1999. Post-copulatory sexual selection in the Mediterranean frit fly: advantages for large and protein fed males. Animal. Behav. 58: 247-254.

TERAN, H. R. 1977. Comportamiento alimentario y su correlación a la reproducción en hembras de Ceratitis capitata (Wied.). Rev. Agronom.. N. O. Argent. 14: 17-34.

THORNHILL, R. and J. ALCOCK. 1983. The evolution of insect mating systems. Harvard university press, Cambridge.547 pp.

TRAIL, P.W. 1983. Cock-of-the-Rock: Jungle Dandy. Natl. Geogr. 164: 831-838.

TRIVERS, R. L. 1972. Parental investment and sexual selection. In Campbell B. (Ed.) Sexual Selection and the Descent of Man. Aldine, Chicago.

TYCHSEN, P.H. 1978. The effect of photoperiod on the circadian rhytham of mating responsiveness in the fruit fly, *Dacus tryoni*. Physiological Entomology, 3: 65-69.

VACCARO, N.C. 1997. Moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae) en la Argentina: taxonomía , distribución geográfica y registro de hospederos. Actas I Taller sobre avances en investigación y apoyo científico al programa Nacional de control y erradicación de moscas de los frutos en Argentina (PROCEM). Buenos Aires.

VEHRENCAMP, S.L. and J.W. BRADBURY. 1984. Mating systems and ecology. In Krebs, J.R. & N.B. Davies (Eds.) Behavioural Ecology and Evolutionary Approach. P. 251-278. Blackwell Scientific Publications. Oxford, U.K.

VERGANI, A.R. 1961. La mosca del Mediterráneo. Boletín de divulgación E.E.A. Concordia.

VIENA. 1994. Report of FAO/IAEA Research Co-ordination Meeting on Medfly Mating Behaviour Studies under field cage conditions. Vienna and Seibersdorf, Austria.

WAAGE, J.K. 1979. Dual function of the damselfly penis sperm removal and transfer. Science 203: 916-918.

WARBURG, M.S. and B. YUVAL. 1997a. Circadian patterns of feeding and reproductive activities of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) on various host in Israel. Ann. Entomol. Soc. Am. 90: 487-495.

WARBURG, M.S. and B. YUVAL. 1997b. Effects of energetic reserves on behavioral patterns of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). Oecología 112: 314-319.

WHARTON, R. A. 1989. Classical biological control of fruit infesting Tephritidae. En Robinson, A.S. y Hooper, G. (eds.) Fruit Flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, 3 (A), pp. 303-314, Elsevier, Amsterdam.

WEBB, J.C., C.O.CALKINS, D.L. CHAMBERS, W. SCHWIENBACHER, and K. RUSS. 1983a. Acoustical aspects of behavior of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: Analysis and identification of courtship sounds. Ent. Exp. Appl. 33: 1-18.

WEBB, J.C., T. BURK, and J. SIVINSKI. 1983b. Attraction of female Caribbean fruit flies, *Anastrpha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae), to the presence of male-produced stimuli in field cages. Ann. Ent Soc. Am. 76: 996-998.

WHITE, I.M. y ELSON-HARRIS, M.M. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. C.A.B. International, Wallingford. 601 pp.

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

WHITTIER, T. S., KANESHIRO, K. Y. And PRESCOTT, L. D. 1992. Mating behavior of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a natural environment. Ann Ent. Soc. Am. 85: 214-218.

WHITTIER, T. S. and T.E. SHELLY. 1993. Productivity of singly vs. multiply mated female Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Kans. Entomol. Soc. 66: 200-209.

WHITTIER, T. S., NAM, F. Y., SHELLY, T. E., AND KANESHIRO, K. Y. 1994. Male courtship success and female discrimination in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Insect Behav. 7: 159-170.

WILLIAMSON, D.L, S. MITCHELL and S. SEO. 1985. Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Effects of the puparial age under induced hypoxia on female sterility. Tropical fruit and vegetable

Research laboratory, Agricultural research service, U. S. departament of Agriculture.

WILLHOEFT, U., and FRANZ, G. 1996. Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. Genetics, 144: 737-745.

WONG, T.T.Y. and L.M. NAKAJARA. 1978. Sexual development and mating response of laboratory-reared and native Mediterranean fruit flies. Ann. Entomol. Soc. Am. 71: 592-596.

WONG, T., NISHIMOTO, J., COUEY, H. 1983. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Further studies on selective mating response of wild and of unirradiated and irradiated, laboratory-reared flies cages. Ann. Entomol. Soc. Am. 76: 51-55.

WONG, T.T.Y., R.M. KOBAYASHI, L.C. WHITEHAND, D.G. HENRY, D.A. ZADIG, and C.L. DENNY. 1984. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): mating choices of irradiated laboratory-reared and untreated wild flies of California in laboratory cages. J. Econ. Entomol. 77: 58-62.

WONG, T.T.Y., M.M. RAMADAN, D.O. McINNIS, and N. MOCHIZUKI. 1990. Influence of cohort age and host age on ovoposition activity and offpring sex ratio of *Biosteres tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 83: 779-783.

YUVAL, B., S. BLAY, and R. KASPI. 1996. Sperm transfer and storage in the mediterranean fruit fly. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 486-492.

YUVAL, B., R. KASPI, S. SHLOUSH,and M. WARBURG. 1998. Nutritional reserves male participation in Mediterranean fruit fly leks. Ecol. Entomol. 23: 211-215.

YUVAL, B., and J. HENDRICHS. 2000. Behavior of flies in the Genus *Ceratitis* (Dacinae: Ceratitidini). En M. Aluja and A.L. Norrbom (Eds.) Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior, pp 429-458. USA.

ZACHAROPOULOU, A. RIVA, M.E., MALACRIDA, A.R. and GASPERI, G. 1991. Cytogenetic characterization of genetic sexing strain in Ceratitis capitata. Genome, 34, 606-611.

ZAPATER, M. and ROBINSON, A.S. 1986. Sex chromosome aneuploidy in male-linked translocation in *Ceratitis capitata.* Can. J. Genet. and Cytol., 28: 161-167.

ZAPIEN, G., J. HENDRICHS, P. LIEDO, AND A. CISNEROS. 1983. Comparative mating behavior of wild and mass-reared sterile medfly *Ceratitis capitata* Wied. On a field caged host tree. Female mate choice. In Cavalloro, R. (Ed.) Fruit Flies of Economic Importance. P. 397-409. A.A. Balkema, Rotterdam.

ZUMREOGLU, A.; OHINATA, K.; FUJINOTO, M.; HIGA, H.; and HARRIS, E.J. 1979. Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly: effect of treatment of immature pupae in nitrogen on emergence, longevity, sterility, sexual competitiveness, maiting ability, and pheromone production of males. J. Econ. Entomol 72: 173-176.