

Tesis de Posgrado

Compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *Ceratitis Capitata* (Díptera : Tephritidae)

Vera, María Teresa

2002

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:

Vera, María Teresa. (2002). Compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *Ceratitis Capitata* (Díptera : Tephritidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3439_Vera.pdf

Cita tipo Chicago:

Vera, María Teresa. "Compatibilidad reproductiva entre poblaciones de *Ceratitis Capitata* (Díptera : Tephritidae)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3439_Vera.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Compatibilidad Reproductiva entre Poblaciones
de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**

Tesista
María Teresa Vera

Director
Dr. Jorge Luis Cladera

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

Laboratorio de Insectos
Instituto de Genética 'Ewald A. Favret'
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA
Castelar

2002

A mis padres

Agradecimientos

Este trabajo de tesis contó con la ayuda de muchas personas a las cuales quiero hacer llegar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer a Jorge Cladera, mi director, el haberme abierto las puertas de su laboratorio y el haberme brindado su tiempo, apoyo, paciencia, afecto y consejos. Agradezco a Fanny Manso su ayuda en todo momento y su observaciones siempre oportunas. Extiendo mi agradecimiento al Director del Instituto de Genética del INTA, Castelar, por permitirme realizar mi trabajo en el Laboratorio de Insectos.

Quiero agradecer muchísimo a Fabián Milla, Alejandra Delprat, Diego Segura, Norberto Campagno, Juliana Pizarro, Mariana Viscarret y Cristina Gómez (casi una más de la familia de las moscas), mis compañeros de laboratorio y amigos, por ayudarme, tantas veces, a cambiar el agua a las moscas, a bajar pupas, a contar adultos, a juntar huevos (!). Muchas gracias por enriquecer tantas horas en el laboratorio.

A Gladys Contrera, INTA Sáenz Peña, a Marisol Frissolo, Daniela de la Vega y PROCEM La Rioja, a Natalia Petit, a Juan Regazzoni, INTA Perico, a Esteban Rial y PROCEM Patagonia, a Luis Santinoni, INTA Catamarca, a Maria Ana Sosa, INTA Reconquista, a Eduardo Willink, Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, a Marcelo de la Vega y a Pedro Rendón, APHIS Guatemala, les agradezco su colaboración en la recolección de material silvestre, ya sea enviándolo al sitio de estudio o ayudándome a realizar las recolecciones de fruta. Agradezco a Norma Vaccaro y Juan Mousques su ayuda y compañía en los viajes de colección.

Quiero agradecer a la gente del laboratorio de Manchester el haber logrado que mi corta visita por allí haya resultado tan agradable. Especialmente muchas gracias a Roger Wood, Melanie Hunt, Caroline Crean, André Guilburn, Charlie Nichols y Derek Dunn.

Quiero agradecer a todo el equipo de las pruebas de jaula de campo. Sin la ayuda de Armando Allinghi, Karina Barborini, Gabriela Bonpland, Graciela Calcagno, Jorge Cladera, Paula Gomez Cendra, Laura Hansen, Tamara Heer, Flavia Krsticevick, Don McInnis, Natalia Petit, Marcela Rodrigueiro, Gonzalo Segade, Diego Segura, Eric Stolar y Juan Vilardi, no podríamos habernos metido en la intimidad del comportamiento de recóputa de las moscas silvestres.

Quiero agradecer a Jorge Hendrichs, Jean-Pierre Cayol y Carlos Cáceres el haberme permitido participar en las reuniones de los grupos de investigación que coordina el Organismo Internacional de la Energía Atómica. Los comentarios y sugerencias recibidos allí mejoraron en gran medida los análisis del capítulo del comportamiento de

recópula. Agradezco a estas personas, así como a Boaz Yuval, Pedro Rendón, Gerald Franz y Alan Robinson, su predisposición a responder mis inquietudes y sus consejos. Quiero agradecer a Fanny Manso y Alejandra Delprat las horas en el microscopio al realizar el estudio citológico de algunas de las cruizas analizadas en este estudio. Extiendo mi agradecimiento también a Antigone Zacharopoulou por permitir que Alejandra realice parte del trabajo en su laboratorio.

Quiero agradecer en forma especial a Don McInnis su permanente buena voluntad para aconsejar, corregir, sugerir y conseguir bibliografía en todos estos años, aún desde lejos.

Agradezco muchísimo a Alejandra Delprat, Diego Segura, Graciela Calcagno, Jorge Cladera, Natalia Petit y Gabriela Pacheco las charlas filosóficas entre mate y mate donde nos planteábamos los objetivos de los trabajos y discurríamos entre transposones, conflictos entre sexos, recópula, aislamiento reproductivo y moscas de la fruta.

Quiero agradecer al personal del Instituto de Genética del INTA, Castelar, a la bibliotecaria Beatriz Quarterolo, y a las secretarias Edith García y Graciela Moglie su predisposición a brindar ayuda. Hago llegar mi más sincero agradecimiento a Eduardo Campagno, Abel Moglie, Miguel Infran y a todo el Personal del Taller por ayudar a armar las jaulas de campo, y por cuidar y regar los ‘arbolitos’ aún cuando nunca logramos una cosecha propia de mandarinas. Mi sincero recuerdo a Oscar Zampayo.

Quiero agradecer a Claudio Lazzari el haberme brindado, junto a su grupo de trabajo, sus concocimientos y consejos. Agradezco a Ana, secretaria del Departamento de Biología de la FCEyN, UBA, su buena predisposición para responder mis preguntas.

Quiero agradecer al CONICET la beca otorgada para realizar este trabajo. Agradezco especialmente a todos los que, conscientes o no, brindan a través de sus impuestos los recursos para que se realice investigación en la Argentina. Agradezco también el apoyo financiero del proyecto PID 615 y el subsidio IAEA RC-8308, otorgados al Dr. Cladera, y a la Fundación Antorchas y al Consejo Británico la beca otorgada para realizar estudios en la Universidad de Manchester, Reino Unido.

Agradezco la enorme contención, estímulo y apoyo recibido por mis Padres, Hermana, Hermanos, Cuñadas, Amigos, mi nueva Familia, y mis adorables Sobrina y Sobrinos.

A Marcelo le agradezco su paciencia en todo el proceso de escritura, sus correcciones, su ayuda y sus consejos. Pero en especial, y mucho más allá de los alcances de esta tesis, agradezco la posibilidad de realizar un proyecto de vida juntos.

A **TODOS** mi agradecimiento, no solo por la ayuda brindada sino también por haberla dado en forma permanente y por haber respetado, e incluso fomentado, mi entusiasmo.

En pocas palabras, ¡un millón de gracias!

Indice

Indice de contenidos

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	4
1.1 <i>Ceratitis capitata</i>	4
Taxonomía y características generales	4
Distribución geográfica.....	5
Ciclo de vida	5
Importancia económica.....	6
Métodos de control	7
1.2 Compatibilidad reproductiva y control de <i>Ceratitis capitata</i>	9
Mecanismo de acción de la TIE	9
Divergencia genética entre poblaciones	10
Aislamiento reproductivo.....	11
Compatibilidad reproductiva y TIE.....	12
2. Hipótesis y Objetivos.....	15
2.1 Hipótesis.....	15
2.2 Objetivos	15
3. Material y Métodos	17
3.1 Obtención de poblaciones silvestres.....	17
3.2 Establecimiento de nuevas líneas	18
3.3 Cría de <i>Ceratitis capitata</i> en el laboratorio.....	18
3.4 Poblaciones y líneas analizadas.....	19
3.5 Pruebas de Jaula de Campo.....	23
Material biológico	23
Identificación de las poblaciones o individuos	23
Jaulas de campo y condiciones experimentales	24
Metodología general	25
3.6 Compatibilidad Post-cigótica	26
Obtención de parejas.....	26
Identificación de cruzas y familias	27
Obtención de la progenie	27
Viabilidad y relación de sexos de la progenie.....	27
Fecundidad de la progenie, viabilidad y proporción de sexos de las retrocruzas o de la F2.....	28

Desarrollo gonadal.....	28
4. Compatibilidad para el Apareamiento.....	31
4.1 Introducción	31
4.2 Material y Métodos.....	36
4.3 Resultados.....	38
Compatibilidad entre las poblaciones Sáenz Peña y Reconquista	38
Compatibilidad entre cuatro poblaciones silvestres y Arg17y-80.....	40
4.4 Discusión.....	43
5. Comportamiento de Recópula	50
5.1 Introducción	50
5.2 Análisis del comportamiento de recópula bajo condiciones de laboratorio	54
Material y Métodos.....	55
Resultados.....	58
5.3 Análisis del comportamiento de recópula bajo condiciones de jaula de campo	68
Material y Métodos.....	69
Resultados.....	71
5.4 Discusión.....	77
6. Compatibilidad Post-cigótica.....	89
6.1 Introducción	89
6.2 Compatibilidad post-cigótica entre Sáenz Peña y Reconquista	93
Material y Métodos.....	93
Resultados.....	94
Interpretación	94
6.3 Compatibilidad post-cigótica entre machos de seis poblaciones silvestres de Argentina y hembras Arg17y-80.....	96
Material y Métodos.....	96
Resultados.....	97
Interpretación	101
6.4 Compatibilidad post-cigótica entre machos de distintas poblaciones silvestres de Entre Ríos y Santa Fé y hembras Taf-99.....	103
Material y Métodos.....	103
Resultados.....	103
Interpretación	106
6.5 Compatibilidad post-cigótica entre distintas líneas analizada a través de una sola de las cruza híbridas	108
Material y Métodos.....	108
Resultados.....	109
Interpretación	112

6.6 Compatibilidad post-cigótica entre distintas líneas analizada a través de las dos cruzas híbridas.....	113
Material y Métodos.....	113
Resultados.....	114
Interpretación.....	117
6.7 Comparación de todas las cruzas realizadas.....	119
Material y métodos.....	120
Resultados.....	121
Interpretación.....	129
6.8 Estudio de casos particulares.....	133
Caso 1: Familias derivadas de cruzas GR x Arg17y-80.....	133
Caso 2: Familias con distorsión de sexos en Con x Arg17y-80.....	137
Caso 3: Familia 38324.....	139
Caso 4: Familia 42525.....	142
Caso 5: Derivados de Gua-98 y Pet-84.....	144
Caso 6: Familias originadas con machos VZ-99.....	146
6.9 Discusión.....	147
7. Discusión General y Conclusiones.....	154
7.1 Discusión.....	154
7.2 Conclusiones.....	158
8. Referencias Bibliográficas.....	160

Indice de Tablas

Tabla 3.1: Origen de las líneas de laboratorio analizadas.....	20
Tabla 3.2: Origen de las poblaciones silvestres analizadas.....	22
Tabla 4.1: Índices de compatibilidad entre SP y Re.....	38
Tabla 4.2: Hora de inicio y duración de las cópulas para las cruzas entre SP y Re.....	40
Tabla 4.3: Índices de compatibilidad entre poblaciones silvestres y Arg17y-80 (L).....	40
Tabla 4.4: Hora de inicio y duración de las cópulas para las cruzas entre poblaciones silvestres y Arg 17y-80.....	42
Tabla 5.1: Índices de compatibilidad entre líneas en el estudio del comportamiento de recópula bajo condiciones de laboratorio.....	58
Tabla 5.2: Duración de la primera cópula para cada tipo de cruce.....	59
Tabla 5.3: Número medio de cópulas para machos y hembras.....	59
Tabla 5.4: Número de individuos que se aparearon una vez o más de una vez.....	60
Tabla 5.5: Valores de χ^2 del modelo de regresión logística.....	60
Tabla 5.6: Duración de la primera cópula para hembras Pet-84.....	61
Tabla 5.7: Duración de la primera cópula para hembras Gua-98.....	62
Tabla 5.8: Período refractario para cada origen de hembra.....	64

Tabla 5.9: Período refractario para cada origen de macho.....	65
Tabla 5.10: Período refractario para aquellas hembras que reaparearon el mismo día	65
Tabla 5.11: Número de cópulas para cada tipo de cruce en la primera y segunda cópula.....	66
Tabla 5.12: ANOVA de cuatro factores para duración de la cópula	67
Tabla 5.13: Duración de la cópula en función del origen del macho y estado copulatorio de machos y hembras.....	67
Tabla 5.14: Duración de la primera y segunda cópula en hembras apareadas con machos vírgenes del mismo origen	68
Tabla 5.15: Cópulas por hembra para cada tratamiento, a lo largo de diez horas de observación según el origen del primer macho.	72
Tabla 5.16: Tasa de recópula para hembras según el origen del macho.....	73
Tabla 5.17: Valores de χ^2 del modelo de regresión logística.....	74
Tabla 5.18: Hora de inicio de la cópula según el origen del macho	74
Tabla 5.19: Duración de la cópula según el origen del macho.....	75
Tabla 5.20: Período refractario en función del origen del primer macho	76
Tabla 5.21: Número de cópulas para cada tipo de macho.....	76
Tabla 6.1: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie en las cruces entre SP y Re	94
Tabla 6.2: Desarrollo gonadal en hembras de cruces provenientes entre SP y Re.....	94
Tabla 6.3: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie en las cruces entre seis poblaciones silvestres y Arg17y-80	97
Tabla 6.4: Viabilidad máxima de la progenie de las retrocruzas.....	98
Tabla 6.5: Proporción de machos de la progenie de las retrocruzas.....	98
Tabla 6.6: Fecundidad de la progenie híbrida	99
Tabla 6.7: Desarrollo gonadal en hembras de cruces provenientes entre seis poblaciones silvestres y Arg17y-80	100
Tabla 6.8: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie, y fecundidad de las hembras progenitoras para cada tipo de cruce entre distintas poblaciones silvestres y Taf-99.....	104
Tabla 6.9: Viabilidad máxima y proporción de machos de la segunda generación, y fecundidad de la progenie	105
Tabla 6.10: Desarrollo gonadal en hembras de cruces entre machos de distintas poblaciones silvestres y hembras Taf-99.....	106
Tabla 6.11: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie híbrida para cada tipo de cruce entre distintas líneas.	109
Tabla 6.12: Proporción de machos de la segunda generación y fecundidad de las hembras de la primer generación.	110
Tabla 6.13: Desarrollo gonadal en hembras provenientes de cruces entre líneas de laboratorio.	112
Tabla 6.14: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie proveniente de cruces entre líneas de laboratorio.	114

Tabla 6.15: Test de Kruskal-Wallis para viabilidad máxima y proporción de machos de la primera generación híbrida.....	116
Tabla 6.16: Proporción de machos de la segunda generación y fecundidad de las hembras de la primer generación.	117
Tabla 6.17: Desarrollo gonadal de las hembras en los cuatro tipos de cruzas posibles entre SR-98 y Pet-84.	117
Tabla 6.18: Frecuencia de familias con valores de viabilidad y proporción de machos en la primera generación anormales en cruzas entre machos silvestres y hembras de laboratorio.	122
Tabla 6.19: Frecuencia de familias con valores de viabilidad y proporción de machos en la segunda generación anormales en cruzas entre machos silvestres y hembras de laboratorio.	123
Tabla 6.20: Frecuencia de familias con valores de viabilidad y proporción de machos en la primera generación anormales en cruzas entre distintas líneas.....	124
Tabla 6.21: Frecuencia de familias con valores de proporción de machos en la segunda generación anormales provenientes de cruzas entre distintas líneas de laboratorio.....	125
Tabla 6.22: Frecuencia de familias con valores de viabilidad y proporción de machos en la primera generación anormales entre distintas líneas de laboratorio.....	125
Tabla 6.23: Frecuencia de familias con valores de proporción de machos en la segunda generación anormales entre líneas de laboratorio.....	126
Tabla 6.24: Proporción de machos en las retrocruzas de la familia 35880.....	133
Tabla 6.25: Viabilidad y proporción de machos en familias originadas de cruzas entre GR y Arg17y-80 luego de 24 generaciones bajo cría de laboratorio.....	135
Tabla 6.26: Viabilidad y proporción de machos en familias originadas de la 38338.....	136
Tabla 6.27: Número de machos y hembras obtenidos para las retrocruzas.....	138
Tabla 6.28: Viabilidad y proporción de machos de la progenie de la retrocruza entre individuos de la familia 38446 y la línea Arg17y-80.	141
Tabla 6.29: Viabilidad y proporción de machos en familias originadas a partir de dos líneas derivadas de la familia 38446.....	141
Tabla 6.30: Viabilidad y proporción de machos en familias derivadas de cruzas homotípicas y heterotípicas en Gua-98 y Pet-84.....	145
Tabla 6.31: Viabilidad y proporción de machos en familias derivadas de cruzas entre machos VZ-99 y hembras SR-98, Yby-99 y VZ-99.....	146

Indice de Figuras

Figura 3.1: Líneas y poblaciones analizadas.....	22
Figura 3.2: Fotografía de una pareja en cópula donde la hembra lleva una marca individual y el macho una marca poblacional.....	25
Figura 3.3: Fotografía del campo experimental del IGEAF, INTA Castelar donde se realizaron las pruebas de jaula de campo.....	26
Figura 3.4: Ovarios con distintos tipos de desarrollo.....	31

Figura 5.1: Número de hembras que reaparearon, en condiciones de alta densidad, en función del origen del macho con el que se aparearon la primera vez.....	63
Figura 5.2: Número de hembras que reaparearon, en condiciones de baja densidad, en función del origen del macho con el que se aparearon la primera vez.....	64
Figura 5.3: Relación entre la hora de inicio de la cópula y la duración de la cópula.....	76
Figura 6.1: Valores de fecundidad para las hembras híbridas de la primera generación.....	112
Figura 6.2: Valores de viabilidad de la primera generación para las cruzas entre líneas.....	116
Figura 6.3: Valores de proporción de machos de la primera generación para las cruzas entre líneas.....	117
Figura 6.4: Ubicación de las distintas cruzas realizadas entre machos silvestres y hembras de laboratorio según el análisis de correspondencias.....	128
Figura 6.5: Ubicación de las distintas cruzas realizadas entre líneas de laboratorio según el análisis de correspondencias.....	129
Figura 6.6: Cromosomas mitóticos de individuos derivados de cruzas entre GR y Arg17y-80	135
Figura 6.7: Cromosomas politénicos de la ceta espatulada de dos machos la familia 42694 portadores de una translocación entre los cromosomas tres y cuatro.....	144
Figura 6.8: Cromosomas politénicos de la ceta espatulada de un macho Taf-99.....	144

Resumen

La mosca de la fruta del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), es una de las principales plagas frutícolas y hortícolas del mundo. Sus larvas se desarrollan en la pulpa de la fruta, de aproximadamente 250 especies vegetales, produciendo daño directo sobre la producción y daño indirecto al restringir los mercados de exportación. Mundialmente, y en ciertas regiones de la Argentina, se la combate con la técnica del insecto estéril. El estudio de la compatibilidad entre poblaciones silvestres y entre poblaciones y líneas de laboratorio puede brindar información relevante para la mejora de dicha medida de control. En el presente trabajo se buscaron evidencias de incompatibilidad en distintas etapas del proceso reproductivo. Se puso especial énfasis en tres aspectos: compatibilidad para el apareamiento, comportamiento de recópula, y compatibilidad post-cigótica. El estudio de la compatibilidad para el apareamiento se realizó en condiciones semi-naturales entre dos poblaciones silvestres y entre cuatro poblaciones silvestres y una línea de laboratorio. El estudio de distintos aspectos del comportamiento de recópula analizó principalmente el efecto del origen del macho con el que se aparea una hembra por primera vez en la propensión a recópula. El mismo se llevó a cabo con hembras de laboratorio bajo condiciones de laboratorio, y con hembras silvestres, en condiciones semi-naturales, con machos silvestres y de laboratorio. Estos últimos, en algunos casos, habían sido esterilizados con irradiación. El estudio de la compatibilidad post-cigótica analizó el desempeño de la progenie de cruzas híbridas en atributos relacionados con la viabilidad, la proporción de individuos de cada sexo, o la fertilidad. Se analizó la compatibilidad entre dos poblaciones silvestres, entre 19 poblaciones silvestres y una de dos líneas de laboratorio y entre 22 cruzas híbridas y las 8 líneas que las originaron. Asimismo, se comparó el desempeño de todas las cruzas con valores de referencia.

Los resultados mostraron la presencia de compatibilidad entre la población silvestre de Sáenz Peña, Chaco, y la de Reconquista, Santa Fe, tanto para el apareamiento como post-cigótica. En el estudio de la compatibilidad para el apareamiento entre cuatro poblaciones silvestres y la línea Arg17y-80, se obtuvieron todas las combinaciones de

pareja posibles, mostrando la ocurrencia de apareamientos entre los individuos del campo y la línea de laboratorio en ambos sentidos. Sin embargo, se observaron también algunas diferencias en el comportamiento sexual entre la línea de laboratorio y los individuos silvestres. Las hembras de las poblaciones de Santa Rosa, Catamarca, y Concordia, Entre Ríos, mostraron una tendencia hacia una falta de aceptación de los machos de laboratorio, sugiriendo un grado incipiente de aislamiento.

El estudio del comportamiento de recópula mostró diferencias entre líneas, tanto en machos como en hembras y confirmó que los machos de laboratorio tienen disminuida la capacidad de inducir refractariedad tanto en hembras silvestres como de laboratorio. Se concluyó que la duración de la primera cópula no es una buena medida del éxito post-copulatorio. Además, mostró que la irradiación tiene un efecto adverso sobre el comportamiento post-copulatorio.

En cuanto a la compatibilidad post-cigótica, en ningún caso se detectó incompatibilidad en forma generalizada en todas las parejas obtenidas de la cruce entre dos orígenes. Sin embargo, para todas las variables analizadas, viabilidad, relación macho:hembra y desarrollo de los ovarios, se observaron familias con anomalías, evidenciando cierto grado de incompatibilidad entre algunos orígenes. En el caso puntual de atrofia gonadal, el fenómeno fue encontrado con mayor frecuencia en las líneas de laboratorio, y en las cruces híbridas, que en las poblaciones silvestres o en cruces entre poblaciones silvestres y líneas de laboratorio. Se postula que en *C. capitata* este fenómeno no está asociado al encuentro entre poblaciones silvestres, o líneas con pocas generaciones bajo cría artificial y líneas con muchas generaciones en el laboratorio como se observó en *Drosophila melanogaster*. Cuando la disponibilidad de material lo permitió y se realizaron las dos cruces recíprocas, se observó que el comportamiento no fue similar entre ellas. Esto llevó a proponer la presencia de factores citoplasmáticos, y a recomendar que los estudios futuros involucren las cuatro cruces posibles.

Abstract

The Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), is one of the main fruit pests of the world. Their larvae develop in the pulp of approximately 250 fruit or vegetable species, producing direct damage on the production and indirect damage by restricting the export markets. Worldwide, and in certain regions of Argentina, this pest is controlled with the Sterile Insect Technique (SIT). The study of the compatibility among wild populations, and between populations and laboratory strains, can provide useful information for the improvement of this control technique.

The present work looked for evidences of incompatibility at different stages of the reproductive process. Special emphasis was placed in three aspects: mating compatibility, remating behaviour, and post-zygotic compatibility. The study of mating compatibility was carried out in field cages under semi-natural conditions between two wild populations and between each of four wild populations and a well-established laboratory strain. The study of different aspects of the remating behaviour focused mainly on the effects of the origin of the first male mated to a female, on the propensity of the female to remate. This study was carried out with laboratory females, under laboratory conditions, with males from different strains, and also with wild females in field cages under semi-natural conditions with wild and laboratory males. These last laboratory strain males, in some cases, had been sterilised with irradiation. Post-zygotic compatibility was analysed by hybrid crosses for traits related to viability and sex ratio of the progeny, as well as female fertility. This study was performed between two wild populations, between nineteen wild populations and one of two laboratory strains, and among eight laboratory strains. A global analysis was performed to compare all the crosses with reference values.

The results showed the presence of both mating and post-zygotic compatibility between the populations of Sáenz Peña, Chaco, and Reconquista, Santa Fe. In the study of mating compatibility among four wild populations and the laboratory strain Arg17y-80, all the possible mating combinations were obtained, showing the presence of matings

between wild individuals and the laboratory strain in both directions. However, some differences were also observed in the sexual behaviours of the laboratory compared to wild populations. Females from Santa Rosa, Catamarca, and Concordia, Entre Ríos, showed a tendency toward reduced acceptance of laboratory males, suggesting an incipient degree of behavioural isolation.

The study of the remating behaviour showed differences among strains, as much in males as in females. It confirmed the fact that laboratory males have a diminished capacity to induce refractoriness to subsequent matings in wild and laboratory females compared to wild males. It is concluded that first mating duration is not a good indirect measure of post-copulatory success. This study also showed that irradiation has an adverse effect on post-copulatory female behaviour.

As for post-zygotic compatibility, in no case was incompatibility detected in a generalised way. However, for all the analysed variables (viability, sex ratio and gonadal development), some abnormal families were observed, demonstrating a certain degree of incompatibility among some strains. In the case of gonadal atrophy, the phenomenon was more frequent in laboratory strains, and in hybrid crosses among them, compared to wild populations or compared to crosses between wild populations and laboratory strains. It is suggested that in *C. capitata* this phenomenon is not associated to the encounter between wild populations, or strains with few generations under artificial rearing, and well-established strains with many generations in the laboratory like it was observed for *Drosophila melanogaster*. When the two reciprocal crosses were performed, they did not behave equally, suggesting the presence of cytoplasmatic incompatibility factors. It is recommended that future studies should involve the four possible crosses.

The results obtained here provide bases for the improvement of certain aspects of the SIT, and allow the formulation of hypothesis related to the reproductive success and the compatibility among strains of various origins in this species.

1. Introducción

Ceratitis capitata

La existencia de especies de insectos plaga de la agricultura, vectores de enfermedades o perjudiciales de alguna manera para el hombre ha llevado a la necesidad de implementar medidas de control que permitan reducir o minimizar el daño causado por ellas. El desarrollo, así como la evaluación de la efectividad de estas medidas, generó y genera una gran demanda de conocimiento sobre la biología de las especies dañinas.

Dentro del orden Diptera, la familia Tephritidae es una de las más grandes y comprende aproximadamente 4.000 especies (Christenson y Foote 1960). Las larvas de muchas de ellas se desarrollan en frutos blandos, incluyendo muchas especies de valor comercial, lo que ocasiona pérdidas en la producción de estas últimas (White y Elson-Harris 1994). Los géneros *Rhagoletis* Loew, *Bactrocera* Macquart, *Toxotrypana* Gerstaecker, *Anastrepha* Schiner, y *Ceratitis* MacLeay, son considerados los de mayor importancia económica (Aluja y Liedo 1993) y *Ceratitis capitata* Wiedemann, la especie que mayor daño ocasiona mundialmente (Capítulo 2, Robinson y Hooper 1989a).

Taxonomía y características generales

Ceratitis capitata es comúnmente denominada mosca de la fruta del Mediterráneo. El género pertenece a la subfamilia Dacinae junto con los géneros *Bactrocera* y *Dacus*, y dentro de la misma está incluido en la tribu Ceratitini, subtribu Ceratitina. Debido principalmente a su importancia económica, esta especie es la más estudiada dentro de la familia, por lo que es posible disponer de numerosos estudios sobre su biología (Díaz-Fleicher y Aluja 2000), muchos de los cuales son referidos en revisiones bibliográficas (Christenson y Foote 1960, Bateman 1972, Robinson *et al.* 1999) y libros editados con la participación de investigadores de cada área de estudio (Cavalloro 1989, Robinson y Hooper 1989ab, White y Elson-Harris 1994, Aluja y Liedo 1993, McPherson y Steck 1996, Tan 2000, Aluja y Norbom 2000). Los conocimientos sobre las otras

especies del género, así como la relación filogenética entre las mismas son escasos (White 1989, DeMeyer, 2000).

Distribución

Desde Africa ecuatorial, su lugar de origen, *C. capitata* colonizó en los últimos 150 años, la región que rodea al mar Mediterráneo (1842), el Sur de África (1889), Australia (1887), América del Sur (1901), Hawai (1910) y América Central (1955) (Fletcher 1989, Sheppard *et al.*, 1992).

En nuestro país los primeros registros relacionados con su presencia en huertos caseros de Buenos Aires datan de 1905 (Vergani 1952). Posteriormente, en 1934, se la reportó en los alrededores de Concordia, y más adelante aparecieron focos en el área de Cuyo y Tucumán. El norte de la Patagonia fue la última región en ser colonizada. Si bien se considera que, originariamente, llegó en frutos provenientes del Mediterráneo, no se posee información confiable acerca de nuevas infestaciones, por lo que, lamentablemente, el o los orígenes de las poblaciones argentinas actuales permanecen aún desconocidos. Antes del inicio de los programas de control y erradicación (ver más adelante), *C. capitata* llegó a establecerse, probablemente, en todas las áreas climáticamente favorables, llegando a ocupar todos los límites de su distribución dentro del país (Vergani 1952). El mismo comprende todas las zonas cálidas y templadas donde encuentre hospederos, principalmente las zonas centro y norte del país. Hacia el sur, donde las condiciones climáticas son más adversas para su desarrollo, disminuye su presencia habiendo sido detectada en áreas urbanas de la zona del Alto Valle, Pcia. de Río Negro. Asimismo, aún en las regiones con las mejores condiciones climáticas, existen áreas con condiciones extremas de calor, exceso de humedad y precipitaciones que pueden imponer restricciones al crecimiento poblacional, o al menos fluctuaciones estacionales (Vera *et al.* 2000).

Ciclo de vida

Luego de la maduración sexual, y una vez producidos los apareamientos, las hembras depositan los huevos dentro de los frutos. En el interior de éstos se produce el desarrollo

embrionario y larvario, reconociéndose tres intermudas larvales. Al completar el tercer estadio la larva abandona la fruta en busca de un lugar seco donde se inmoviliza. La cutícula larval se endurece y oscurece, formando el pupario, dentro del cual transcurren los estadios sucesivos, prepupal, pupal y adulto farado. Durante los mismos, se producen las transformaciones externas e internas que darán lugar al adulto o imago, que luego madurará sexualmente e iniciará una nueva etapa reproductiva cerrando el ciclo. Normalmente una hembra pone de dos a diez huevos por punción y entre 300 y 1000 a lo largo de toda su vida. A 25°C el ciclo dura aproximadamente 25-30 días. Sin embargo, como es común en insectos, la duración de las distintas etapas del mismo está afectada en forma significativa por la temperatura (Back y Pemberton 1918, Bodenheimer 1951, Christenson y Foote 1960, Shoukry y Hafez 1979). Esto determina, junto con la oportunidad de hospederos, el número de generaciones anuales. Las temperaturas cálidas y templadas y los niveles altos, pero no extremos, de humedad representan las condiciones climáticas óptimas para su reproducción.

Importancia económica

C. capitata ocasiona un grave daño en las economías frutícolas a nivel mundial, debido a su amplia distribución y a su capacidad de infestar más de 250 hospederos (Christenson y Foote 1960, Liquido *et al.*, 1990). En Argentina los frutales más infestados son los de carozo: durazno, damasco, ciruela, etc., pero también ataca naranja, mandarina, pomelo, pera, manzana, membrillo, higo, frutales silvestres y algunas especies hortícolas en menor grado. Junto con la mosca sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* Wiedemann, producen un impacto económico, por daño directo, que se estima entre el 15 y 20% de la producción frutícola nacional (Alvarado y Ritacco 1990). Los costos y limitaciones de los tratamientos químicos, la restricción a la exportación de frutas y verduras frescas a países libres de estas plagas (Malavasi *et al.* 1994), o en todo caso los costos cuarentenarios, incrementan enormemente el impacto de las mismas sobre las economías regionales (Nuñez-Bueno 1987).

Métodos de control

Los métodos de control que se emplean para disminuir los niveles poblacionales de *C. capitata* por debajo del nivel de daño económico son numerosos. Esto responde principalmente al hecho que esta plaga se encuentra distribuida a escala mundial y las diferentes características ecológicas, económicas y políticas de cada área afectada requieren una solución específica. Los mismos incluyen control químico, biológico, cultural o genético, y tratamientos postcosecha o cuarentenarios (ver el capítulo de medidas de control de Robinson y Hooper (1986a) para una enumeración completa de los distintos métodos y Moreno y Mangan (2000) y WGFFWH (2001) para una actualización).

El control químico es uno de los más usados mundialmente. Sin embargo, el incremento en la demanda de fruta no tratada con insecticidas (Hendrichs *et al.* 1995) así como el creciente número de especies resistentes a los mismos (Crampton 1993) han llevado a la necesidad de implementar, entre otras medidas, el control genético.

Dentro de los métodos de control genético (Curtis 1985), se encuentra el control autocida propuesto por Knippling (1955) y conocido como Técnica del Insecto Estéril (TIE). Este se basa en la capacidad de criar, esterilizar y liberar insectos, sexualmente competitivos con los individuos silvestres, de manera tal que aquellas hembras que se apareen solamente con un macho estéril no producirán descendencia disminuyendo el tamaño poblacional con sucesivas repeticiones del proceso (Metcalf y Luckman 1994). Estudios realizados en el campo mostraron que la liberación de machos solos es más efectiva que la liberación de individuos de ambos sexos (McInnis *et al.* 1994, Hendrichs *et al.* 1995, Rendon *et al.* 2000). La presencia de hembras de laboratorio en el campo es no deseable por dos motivos. Uno es el hecho que, aún estériles y sin huevos maduros en sus ovarios, las hembras de laboratorio mantienen el comportamiento de oviposición y perforan la fruta permitiendo la entrada de patógenos y, por lo tanto, el deterioro de la misma. El otro es que se aparean con los machos estériles y disminuyen el comportamiento de búsqueda de pareja de los mismos, evitando que lleguen a las hembras silvestres. Para evitar entonces la liberación de hembras de laboratorio, en los últimos años se han obtenido líneas de cría masiva que permiten la separación de los

sexos, en forma rápida y eficiente a gran escala. Esto se logra gracias a la presencia de mutaciones, en un gen separador, ligadas a los cromosomas sexuales (Robinson *et al.* 1999). Estas líneas, conocidas con el nombre de Líneas de Sexado Genético (LSG) (Whitten 1969) no sólo son ventajosas al evitar la liberación de hembras, sino que también pueden llegar a reducir los costos en la producción si el gen separador actúa en algún estadio temprano del desarrollo (Manso y Lifschitz 1992, Rendón 1996, Cladera 1995). La TIE es utilizada exitosamente con LSG en varios lugares del mundo (Cunningham *et al.* 1980, Klassen *et al.* 1994, Hendrichs *et al.* 1995, Krasfur 1998) incluyendo la Argentina (Aruani *et al.* 1996, De Longo *et al.* 2000).

Es importante notar que todos estos métodos de control deben estar acompañados de un sistema de monitoreo permanente que permita conocer en forma precisa los niveles de infestación o detectar la aparición de un foco de infestación y de esta forma orientar las estrategias a seguir.

En nuestro país, el Programa de Control y Erradicación de Moscas de los Frutos (PROCEM), con coordinación central en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), tiene tres objetivos principales: erradicar esta plaga en aquellas zonas donde es técnica y biológicamente factible, obtener el reconocimiento internacional una vez alcanzado dicho logro, y minimizar el impacto en las zonas donde su erradicación es técnicamente más difícil o incluso no recomendable (Cosenzo *et al.* 1997). Para alcanzar estos objetivos, se dividió al país en distintas áreas, se establecieron sub-programas dentro de cada región, y se comenzaron con las medidas de monitoreo y control en alguno de ellos. Actualmente las provincias de Mendoza (PROCEM-Mendoza) y San Juan (PROCEM-San Juan), junto con la región Patagónica (PROCEM-Patagonia), utilizan a la TIE como principal medida de control (Aruani *et al.* 1996, De Longo *et al.* 2000). En la provincia de La Rioja (PROCEM-La Rioja) se ha comenzado con una primera etapa de control químico y se tiene previsto iniciar en un futuro cercano el uso de insecto estéril (Frissolo 2000). En el resto de las provincias con producción frutícola, región del Noroeste (NOA) y del Noreste (NEA) y en el norte de la provincia de Buenos Aires, todavía no se iniciaron las acciones de los sub-programas

y los productores deben aplicar las medidas de control en forma particular. Las mismas generalmente consisten en control químico.

Compatibilidad reproductiva y control de *Ceratitis capitata*

Todas las medidas de control mencionadas se ven beneficiadas con el aporte que realizan los estudios relacionados con aspectos biológicos de esta especie (Messing 1996). Por ejemplo, el estudio del comportamiento de búsqueda de alimento o forrajeo (revisado en Drew y Yuval 2000, Yuval y Hendrichs 2000) brinda claves para la mejora del control químico con cebos alimenticios. Así como el estudio cuidadoso de la biología reproductiva (Makela y Richardson 1978) pudo explicar los pocos casos registrados de falla de la TIE en otras especies (Richardson 1978, Hibino e Iwahashi 1991, Alcock y Gwynne 1991), y también pudo explicar casos de marcada disminución de su efectividad en *C. capitata* (McInnis *et al.* 1996, Cayol com. pers.).

Mecanismo de acción de la TIE

Los conceptos en los que se basa la TIE, están directamente involucrados con distintos aspectos de la biología reproductiva de la especie plaga. El éxito de la TIE se basa en la capacidad de los machos liberados de alcanzar la cópula y de desencadenar en la hembra una respuesta similar a la desencadenada a partir de la cópula con un macho de la naturaleza (Thornhill y Alcock, 1983). Para ello, los machos estériles deben sobrevivir en el campo, un ambiente totalmente hostil, hasta llegar a la madurez sexual. Luego, deben competir con los machos silvestres por la posesión de hembras silvestres de la población a controlar, desplegar el comportamiento de cortejo necesario y correcto para ser aceptados por las mismas, aparearse, transferir esperma y productos derivados de las glándulas accesorias, y por último, ser capaces de disminuir la receptividad de la hembra causándole refractariedad a la siguiente cópula y, eventualmente, desencadenar el comportamiento de oviposición. Muchos de estos pasos se pueden ver afectados por los procesos de cría. Asimismo, distintas poblaciones blanco pueden presentar distintos patrones de preferencias o comportamientos que lleven a un macho estéril a ser exitoso en el control de una población pero no en otra. Es claro que para que esta medida sea

exitosa no se deben producir cambios entre las poblaciones o entre las líneas de cría y las poblaciones blanco que afecten el proceso reproductivo. Sin embargo, esto no siempre ocurre y las poblaciones divergen genéticamente.

Divergencia genética entre poblaciones

Existen dos procesos, de ocurrencia común en *C. capitata*, que pueden llevar a la divergencia genética, y por lo tanto, ocasionar incompatibilidad reproductiva entre poblaciones silvestres o de laboratorio.

Uno de ellos es la pérdida de diversidad genética seguida de deriva. Cuando pocos individuos de una especie colonizan un nuevo habitat, y su produce lo que se denomina *efecto fundador*, se pueden generar cambios genéticos importantes como consecuencia de la ocurrencia de deriva génica, seguida luego de pocas restricciones selectivas en la variación genética remanente (Carson y Templeton 1984, Rundle *et al.* 1998). Este proceso ocurre en dos contextos dentro de esta especie: durante la invasión y colonización de nuevas áreas (ver Bonizzoni *et al.* 2000 y las citas que allí se mencionan) y durante la colonización o domesticación (aquí ambos términos serán considerados sinónimos) que se produce al establecer líneas de cría en el laboratorio (Roush y Hopper 1995).

El otro proceso que lleva a la divergencia genética, es la presencia de una fuerte selección direccional, muchas veces no intencional, dentro del laboratorio (Roush y Hopper 1995). Existen ejemplos en, *C. capitata*, de cambios en distintos aspectos del comportamiento de cortejo en machos de laboratorio que afectan la competitividad sexual de los mismos (Briceño *et al.* 1996, Briceño y Eberhard 1998, Calcagno *et al.* 1999, Calcagno 2001). Si bien en la naturaleza esta especie está expuesta a distintas presiones de selección, debidas principalmente a la amplia distribución que posee y a la cantidad de especies frutales que utiliza como hospederas, no se han realizado estudios tendientes a evaluar el posible impacto en la estructuración genética de las poblaciones (Roderick 1996). Tampoco se han realizado estudios que analicen el posible impacto del uso de insecticidas en la reducción de la variabilidad genética o en la inducción de

mutaciones, lo cual es llamativo si se considera la enorme presión que se ejerce sobre las poblaciones durante los meses de producción frutícola (Picollo *et al.* 1994).

La presencia de diferencias genéticas entre los individuos de distintas poblaciones puede resultar en la aparición de casos de incompatibilidad, limitando el flujo génico entre las mismas. Esta falta de compatibilidad puede llevar incluso al desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo los cuales están íntimamente asociados con el proceso de formación de nuevas especies o especiación (Fisher 1930, Dobzhansky 1937, Mayr 1940, 1942, Müller 1942).

Aislamiento reproductivo

Los mecanismos de aislamiento reproductivo consisten en todos los impedimentos condicionados genéticamente para el intercambio de genes entre las poblaciones (Dobzhansky 1937). Dichos mecanismos se clasifican en dos grandes grupos: aquellos que actúan antes de la fertilización de las gametas, conocidos como mecanismos de aislamiento pre-cigóticos, y aquellos que actúan luego de la fertilización, o mecanismos post-cigóticos.

El aislamiento pre-cigótico se puede a su vez dividir en cinco sub-grupos que se denominan ecológico, temporal, etológico, mecánico y gamético. En el aislamiento ecológico o de hábitat, los individuos no se encuentran porque ocupan distintos hábitats o biotopos en el mismo territorio. En el aislamiento estacional o temporal, los individuos no se encuentran porque presentan una maduración sexual desfasada o niveles de actividad sexual en distintos momentos del día o de la estación reproductiva. En el aislamiento etológico o sexual los individuos se encuentran y están sexualmente maduros, en el mismo lugar y al mismo tiempo, pero no se aparean debido a la falta de atracción sexual entre los mismos. Esto es común en animales que poseen cortejos elaborados y utilizan los mismos para reconocer a sus pares. En el aislamiento mecánico, la fertilización no se puede producir porque existen constricciones mecánicas entre las genitalias. En el aislamiento gamético, las gametas femenina y masculina no se atraen, o las gametas masculinas son inviables en el tracto reproductor femenino, como sucede cuando existe algún tipo de respuesta antigénica hacia el esperma.

Por su parte el aislamiento post-cigótico también puede ser dividido en tres sub-grupos. En el primero, las cigotas híbridas son inviables o tienen muy baja viabilidad. En el segundo, la progenie, o F1, es viable pero resulta estéril debido a problemas en la gametogénesis, ocasionados generalmente por diferencias cromosómicas. En el tercero, es la progenie de los híbridos la que presenta una elevada reducción en la viabilidad o en la fertilidad, conocido como degradación del híbrido.

Si bien no todos los mecanismos de aislamiento operan en forma simultánea, en la mayoría de los casos ocurren más de uno. El aislamiento pre-cigótico es claramente más eficiente ya que evita un gasto en gametas y recursos en la producción de progenie no viable o estéril. Esto permite plantear que, aquellas especies que no coexisten y presentan mecanismos de aislamiento post-cigótico, desarrollarán mecanismos pre-cigóticos una vez que se encuentren (Fisher 1930, Dobzhansky 1937, 1940).

Compatibilidad reproductiva y TIE

La ocurrencia de divergencia genética, puede alterar, en cierta medida, algún paso dentro del proceso reproductivo, o resultar en la presencia de incompatibilidad entre distintas poblaciones y/o líneas, y por lo tanto disminuir el buen funcionamiento de la TIE. El estudio de la compatibilidad pre-cigótica, o, dicho de otra forma, de los mecanismos de aislamiento reproductivos pre-cigóticos, brindan el marco teórico necesario para evaluar posibles fallas en la TIE asociadas a la falta de compatibilidad entre poblaciones o a una diferencia de competitividad entre machos de distinto origen. La presencia de aislamiento estacional, o de hábitat, podría originarse en un comportamiento totalmente desviado en los machos de laboratorio, como por ejemplo no saber encontrar los sitios de apareamiento, o estar sexualmente activos a una hora del día donde las hembras silvestres realizan otras actividades. La presencia de aislamiento etológico podría surgir de una marcada diferencia en los comportamientos de cortejo de los machos estériles con respecto a los silvestres y, por lo tanto, no ser aceptados por las hembras silvestres. La falla en la capacidad de despertar en las hembras un comportamiento similar al que se sucede luego de una cópula con un macho fértil, es

decir reducción en la receptividad y oviposición, podría ser tomado como un caso especial de aislamiento gamético. Si bien, el esperma no es destruido, una segunda cópula podría ser suficiente para evitar el uso del esperma del primer macho en la fecundación de los huevos (Simmons y Siva-Jothy 1998). La posibilidad de un uso preferencial del esperma proveniente de distintos machos, no fue considerada con el mismo grado de importancia como lo fueron los mecanismos de aislamientos pre-copulatorios y post-cigóticos, posiblemente debido a la dificultad para estudiarla experimentalmente (Markow 1997). Sin embargo, dentro del marco de la TIE podría llegar a resultar importante.

Si bien a primera vista, parece que sólo el estudio de la compatibilidad pre-cigótica tiene un impacto directo sobre la TIE, las evidencias actuales muestran que se debe tener en cuenta todo el proceso reproductivo. El uso mundialmente extendido de la TIE y de las LSG, con la necesidad que esto trae de aumentar la producción de las biofábricas, ha llevado a querer incorporar material genético silvestre en las líneas de cría masiva, muchas veces sin el éxito esperado (Franz citado en Cayol 2000a). Esto, sumado a la presencia de hembras con ovarios atrofiados cuando se cruzan líneas de distinto origen (Torti *et al.* 1994, Spinoglio *et al.* 1997, Gasperi y Rendón, com. pers.), señala la existencia de ciertos casos de incompatibilidad post-cigótica. Para poder avanzar en la mejora de la calidad de los machos estériles y así alcanzar avances significativos en el control de esta especie, la determinación de la compatibilidad entre poblaciones y/o líneas de *C. capitata*, no deberían limitarse a en estudios que abarquen solamente los aspectos pre-cigóticos.

Los insectos resultan un grupo interesante para el estudio de los mecanismos de especiación, de las relaciones filogenéticas entre especies cercanas y de la compatibilidad entre poblaciones. El ciclo de vida relativamente corto, en relación con el del ser humano, permite estudiar muchas generaciones en períodos experimentalmente manejables. Asimismo, existen estudios sobre los mecanismos de aislamiento reproductivo actuantes en especies cercanas (ver Civetta y Sing 1999 y las citas que allí se mencionan) y se han informado ejemplos de incompatibilidad entre poblaciones de una misma especie dentro del género *Drosophila* (Kidwell 1982, Wu *et*

al. 1995) y de la familia Tephritidae (Hibino e Iwahashi 1991, Torti *et al.* 1994, McInnis *et al.* 1996). En algunos casos y se han analizado los mecanismos de acción o las causas que la originaron. Algunos de estos ejemplos, no son sólo buenos modelos de estudio desde el punto de vista de las teorías evolutivas sino que también están estrechamente ligados al hombre por el impacto que tienen sobre la economía o la salud.

La importancia económica de *Ceratitis capitata* a nivel mundial, sumado a la historia de colonización y dispersión, la facilidad para la cría y obtención de material silvestre y el uso generalizado de medidas de control que requieren de sólidos conocimientos sobre su biología, hacen de esta plaga, un modelo de estudio interesante. En la presente tesis se estudiaron distintos aspectos de la compatibilidad reproductiva, tanto pre-cigótica como post-cigótica, entre poblaciones silvestres y/o líneas de laboratorio poniendo especial énfasis en detectar evidencias de divergencias genéticas que puedan afectar, en cierta medida, el buen funcionamiento de la TIE.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

H₀: Las poblaciones silvestres de *Ceratitis capitata*, así como las líneas de laboratorio que se originaron de estas, presentan suficiente similitud genética como para que se manifieste una total compatibilidad reproductiva entre las mismas.

H₁: Existe cierto grado de divergencia genética, originado ya sea en el campo o en el laboratorio, capaz de generar incompatibilidad entre poblaciones silvestres y/o líneas de distinto origen o historia. Esta incompatibilidad se puede presentar a lo largo del proceso reproductivo ya sea a nivel pre-cigótico o post-cigótico.

2.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis fue ampliar los conocimientos de la biología reproductiva de *Ceratitis capitata* desde el estudio de la compatibilidad entre poblaciones silvestres y/o entre líneas de laboratorio con distinto origen y número de generaciones bajo cría artificial.

Los objetivos específicos fueron:

- A. Analizar el grado de compatibilidad pre-cigótica estudiando,
 - I. la presencia de aislamiento etológico o incompatibilidad para el apareamiento entre:
 - ✓ dos poblaciones silvestres
 - ✓ distintas poblaciones silvestres y una línea de laboratorio

II. la presencia de aislamiento gamético, inferida a través de una propensión a la recóputa diferencial en función del origen del primer macho y de otras características de la primera cóputa, en:

- ✓ hembras de laboratorio
- ✓ hembras silvestres

B. Determinar el grado de compatibilidad post-cigótica

- ✓ entre distintas poblaciones silvestres y una línea de laboratorio con muchas generaciones bajo cría artificial
- ✓ entre distintas poblaciones silvestres y una línea de laboratorio con pocas generaciones bajo cría artificial
- ✓ entre líneas del laboratorio con diferente número de generaciones bajo cría artificial y distinto lugar de origen.

3. Material y Métodos

En el desarrollo de esta tesis se realizaron pruebas de compatibilidad para el apareamiento bajo condiciones de jaula de campo, estudios de recópula, estudios de compatibilidad post-cigótica a través de cruza dirigidas en el laboratorio para la obtención de progenie, establecimiento de líneas de cría a partir de poblaciones silvestres obtenidas del campo, y mantenimiento de dichas líneas. Algunos de los procedimientos y métodos son comunes a los distintas partes del trabajo por lo que se los describirá a continuación. En los capítulos siguientes se especificarán, cuando las hubiere, las variantes metodológicas propias a cada experimento. Como el análisis de los datos estuvo muy relacionado al objetivo puntual por el cual se realizó cada prueba, se lo presenta en cada capítulo y sección correspondiente. Todos los tests fueron realizados con el paquete estadístico STATISTICA (StatSoft, Inc. 2000).

3.1 Obtención de poblaciones silvestre

Para obtener suficiente número de individuos silvestres con aproximadamente la misma edad, lo más conveniente es realizar recolecciones de fruta infestada con larvas y criarlas hasta el estado de adulto. En las distintas localidades de interés, se buscaron fincas abandonadas, con poco manejo contra moscas de la fruta, árboles frutales en casas particulares o árboles frutales en la vía pública que presentaran signos de infestación. Se procedió a coleccionar fruta tanto del árbol como del suelo. Se acondicionó la misma para su transporte hasta el Instituto de Genética del INTA-Castelar donde se la colocó en bandejas plásticas con perforaciones en su fondo. Debajo de dicha bandeja se colocó otra bandeja con arena. A medida que se completaba el desarrollo larvario, las larvas abandonaron la fruta y se desplazaron hacia la arena donde comenzó la fase de pupa. Periódicamente se tamizó la arena para la recolección de las pupas y las mismas se colocaron en una cámara con humedad, fotoperíodo y temperatura controladas para maximizar la emergencia de adultos.

3.2 Establecimiento de nuevas líneas al laboratorio

Cuando se colectó material silvestre de una determinada población con el objetivo de establecer una nueva línea, se colocaron las pupas obtenidas en un frasco de vidrio (3 lts.) con agua y comida. Una vez que las moscas alcanzaron la madurez sexual se colocó el frasco en un lugar apropiado para que se produzcan los apareamientos. La primera recolección de huevos se realizó sobre fruta natural, proveniente de zonas libres de la plaga (ej. Chile) o de zonas donde la plaga está presente en baja prevalencia (ej. Mendoza o Patagonia). Se dejaron frutas como testigos de que en su interior no se estuvieran desarrollando larvas de *Ceratitis* provenientes de la zona de producción. Además, se colocó una fruta artificial con la goma espuma embebida en jugo de frutas. Luego de dos o tres días se reemplazó la fruta natural. Se la colocó en un recipiente plástico (1 lt.) con arena, se tapó para evitar la oviposición de otras moscas y se la dejó por 5-7 días. En ese momento, se abrió la fruta y se colocaron las larvas presentes, junto con la pulpa de la fruta, sobre un recipiente con dieta para larvas. De esta forma, se complementó con dieta artificial para evitar problemas debidos a una alta densidad de larvas en la fruta. Se colocó el recipiente en un frasco con vermiculita o arena y una vez completado el desarrollo se tamizó la vermiculita, o arena, para obtener las pupas. De esta forma se inició la siguiente generación a la que también se la expuso a fruta natural y fruta plástica. En la generación siguiente se obtuvieron la totalidad de huevos de la fruta artificial y se la siguió criando en forma rutinaria.

3.3 Cría de *Ceratitis capitata* en el laboratorio

Las líneas o cepas se criaron sobre una base de 300-500 individuos por generación. Cada generación se inició en un frasco de vidrio (3 lts.) donde se colocaron aprox. 300-500 pupas, dieta para adultos (sacarosa y levadura en una relación 3:1), y agua. Los frascos llevaban tapas de goma espuma para permitir la ventilación sin que se escapen las moscas. Una vez alcanzada la madurez sexual, aproximadamente 5-7 días después de iniciada la emergencia, se colocaron frutas artificiales. Estos dispositivos de oviposición consisten en esferas plásticas perforadas con una pequeña goma espuma en el interior, humedecida para evitar la desecación de los mismos (Terán 1977). Una vez

pasadas 48 h. desde la colocación de la fruta, se tomó la misma, se agregó agua destilada en su interior, se agitó y se vertió el contenido en un embudo con papel de filtro. Se dejó decantar y se colocó el papel de filtro sobre un recipiente (60 ml) con alimento para larvas el cual consistió en la dieta propuesta por Terán (1977) con pequeñas modificaciones (Quesada Allué *et al.* 1994). Este recipiente fue colocado en un frasco con vermiculita y tapado con goma espuma. Los tres estadios larvales se desarrollaron en este medio, y las larvas del último estadio empuparon en la vermiculita. Luego de aproximadamente dos semanas se tamizó la vermiculita para obtener las pupas. De esta forma se dispuso de material para iniciar la generación siguiente.

3.4 Poblaciones y líneas analizadas

A lo largo de este trabajo se analizaron diversas poblaciones de la Argentina en estado silvestre así como distintas líneas de laboratorio con distintos orígenes y número de generaciones bajo cría artificial. Asimismo se analizaron una población silvestre de Guatemala, dos líneas originadas con material de ese país y una línea originada con material de Egipto. Cada población silvestre recibió un nombre relacionado a la localidad donde se realizó la recolección. Cuando se colectó en un mismo sitio más de un hospedero o en más de una ocasión, el nombre llevó alguna otra característica para identificar a las poblaciones entre sí. Cada línea recibió un nombre relacionado a la localidad de origen y al año en que se la introdujo al laboratorio. En los casos en que las líneas fueron originadas por otras personas, e incluso en otros institutos, y cedidas para su estudio se respetó el nombre original. La Tabla 3.1 presenta un listado de las líneas de laboratorio utilizadas indicando la localidad, el hospedero del cual fue obtenido el material, el año de recolección así como el experimento donde se usó cada una de ellas. En la Figura 3.1 se muestra, para la República Argentina, la ubicación geográfica de los sitios donde se obtuvo el material silvestre que originó dichas líneas, así como la ubicación de las poblaciones silvestres analizadas.

Nombre	Localidad	Provincia ¹	Hospedero	Fecha	Uso
Arg17y-80	Ituzaingó - Castelar	Buenos Aires	Durazno	Aprox. 1980	CA CPC
Pet-84	Cerca del lago Atitlán	Guatemala	Café	1984	CPC CR
Cast-191	Mendoza	Mendoza	Durazno	Aprox. 1992	CR
SP-98	Sáenz Peña	Chaco	Durazno	Diciembre 1997	CPC
Guate-98	Retalhuleu	Guatemala	Café	Febrero 1998	CPC CR
SR-98	Sta. Rosa	Catamarca	Naranja	Abril 1998	CPC
Chi-98	Chilecito	La Rioja	Durazno	Enero 1999	CPC
Taf-99	Taficillo	Tucumán	Durazno	Enero 1999	CPC
Yby-99	Finca Ybyraty, Humaitá	Entre Ríos	cuaresmillo Mandarina	Marzo 1999	CPC
VZ-99	Villa Zorraquín	Entre Ríos	Guayaba	Marzo 1999	CPC
Seib 6-96	-	Egipto	-	1977/1983	CR

Tabla 3.1: Origen de las líneas de laboratorio analizadas y tipo de estudio en las que se las utilizó.

¹Para el material proveniente de Guatemala o Egipto, no se indica la provincia sino el país. Para cada línea se indica el experimento donde se la uso. CA: compatibilidad para el apareamiento, CPC: compatibilidad post-cigótica, CR: comportamiento de recópula.

Arg17y-80 se originó de un subcultivo de la cepa Arg17 del cepario del IGEAF, INTA Castelar y presenta un cromosoma Y más pequeño que el normal (F. Manso, com. pers.). Gua-98 fue introducida en el laboratorio de la Unidad de Entomología de la Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad de Manchester, Reino Unido, con material recolectado en Guatemala en febrero de 1998 (Hunt, com. pers.). Pet-84 provino de un subcultivo de la línea Petapa, que se criaba, al momento de su utilización, a gran escala en la bioplanta de machos estériles de Guatemala (Rendón 1996). Estas dos líneas fueron gentilmente cedidas por los Dres. Roger Wood y André Guilburn. Cast-191 y Seib 6-96 son líneas de sexado genético. La primera, es portadora de una translocación Y-autosoma, T(Y:2) (Delprat *et al.* en prensa) y del gen *sw* (Cladera 1995). Esta línea fue originada a partir de pupas de la línea Mendoza, utilizada en 1994 en el Insectario BioKm8 del ISCAMen, la cual a su vez se originó con material silvestre de la provincia de Mendoza. Actualmente, se la cría en el IGEAF, INTA Castelar utilizando jaulas de aproximadamente 5.000 individuos. Seib 6-96 es portadora de una translocación T(Y:5), (Franz *et al.* 1994) y del gen *wp* (Rössler 1979). Fue originada en 1996 en los laboratorios del Organismo Internacional de la Energía Atómica, utilizando un macho, de la línea EgII, originada con material de Egipto en 1983, portador de la translocación,

y hembras homocigotas para el gen *wp* de la línea establecida en 1977 por Rössler (1979). Se consideró que llevaba, al momento del estudio, más de 200 generaciones bajo cría artificial.

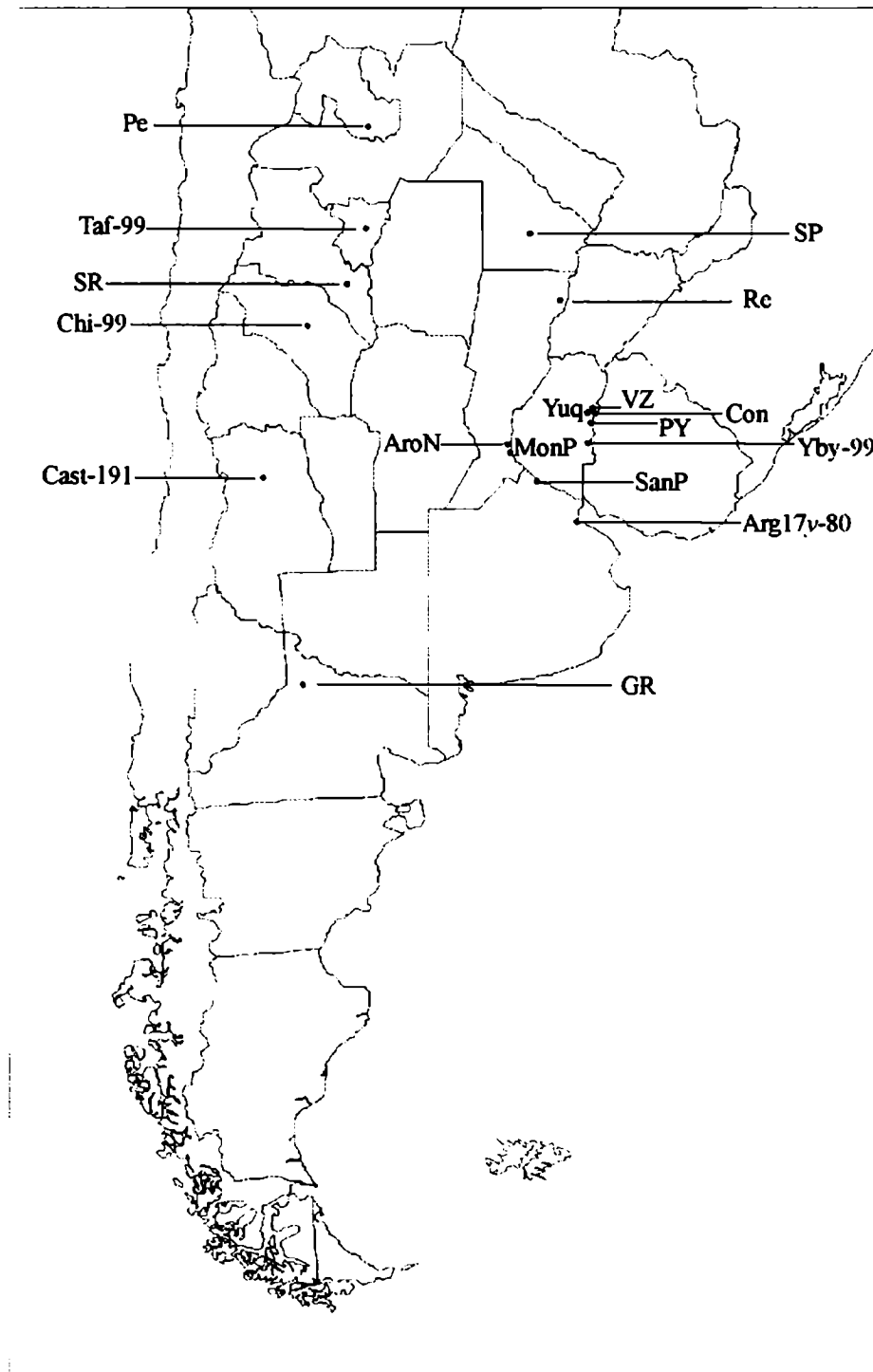


Figura 3.1: Líneas y poblaciones analizadas. En las localidades donde se muestro más de una población u hospedero, así como en las que se analizó material silvestre y luego se estableció una línea de cría, se indica el nombre de la localidad solamente.

En la Tabla 3.2 se puede ver el nombre que recibió cada población silvestre, así como la localidad de donde se obtuvo el material, el hospedero del cual provino, el año de recolección y el experimento donde se usó la misma.

Nombre	Localidad	Provincia ¹	Hospedero	Fecha	Uso
GR	Varias en la zona de Alto Valle	Río Negro	Manzana, Higo, Durazno	Marzo 1997	CA CPC
Pe	Perico	Jujuy	Naranja	Noviembre 1997	CA CPC
SP	Sáenz Peña	Chaco	Durazno	Diciembre 1997	CA CPC
Re	Reconquista	Santa Fe	Durazno	Diciembre 1997	CA CPC
Con	Concordia	Entre Ríos		Marzo 1998	CA CPC
SR	Santa Rosa	Catamarca	Naranja	Abril 1998	CA CPC
Ant	Antigua	Guatemala	Café	Septiembre 1998	CR
SanP	San Pedro	Buenos Aires	Durazno, Manzana	Enero – Febrero 2000	CR
ConSD	Concordia Sur	Entre Ríos	Durazno	Diciembre 2000	CPC
ConSN	Concordia Sur	Entre Ríos	Naranja	Diciembre 2000	CPC
VZ1N	Villa Zorraquín	Entre Ríos	Naranja	Diciembre 2000	CPC
VZ2N	Villa Zorraquín	Entre Ríos	Naranja	Diciembre 2000	CPC
VZ3N	Villa Zorraquín	Entre Ríos	Naranja	Diciembre 2000	CPC
PYM	Puerto Yerúa	Entre Ríos	Mandarina	Diciembre 2000	CPC
PYD	Puerto Yerúa	Entre Ríos	Durazno	Diciembre 2000	CPC
Yuq	Yuquerí, INTA Concordia	Entre Ríos	Durazno	Diciembre 2000	CPC
ConND	Concordia Norte	Entre Ríos	Durazno	Diciembre 2000	CPC
MonP	Quinta La Molla, Monge	Santa Fe	Pomelo	Diciembre 2000	CPC
AroN	Quinta El Cerro, Arocena	Santa Fe	Naranja agria	Diciembre 2000	CPC
VZ1G	Villa Zorraquín	Entre Ríos	Guayaba	Febrero 2001	CPC
ConNG	Concordia Norte	Entre Ríos	Guayaba	Febrero 2001	CPC

Tabla 3.2: Origen de las poblaciones silvestres analizadas en el presente trabajo y tipo de estudio en las que se las utilizó. ¹En los casos de material proveniente de Guatemala, no se indica la provincia sino el país. CA: compatibilidad para el apareamiento, CPC: compatibilidad post-cigótica, CR: comportamiento de recópula.

3.5 Pruebas de Jaula de Campo

Las pruebas de jaula de campo consistieron en la observación de distintos patrones del comportamiento en individuos liberados en una jaula, confeccionada con una malla plástica y colocada sobre un árbol frutal joven a la intemperie. Si bien ciertos procedimientos variaron en función de los objetivos de cada prueba, los preparativos que involucraron la obtención del material biológico, el marcado de los individuos, el armado de las jaulas y el desarrollo general de las pruebas fueron comunes y se describen a continuación.

Material biológico

Las pruebas fueron realizadas con individuos vírgenes sexualmente maduros, ya sea de poblaciones silvestres o de líneas de cría. Para obtenerlos, a medida que emergían los adultos de las pupas (obtenidas como se mencionó anteriormente), se los aspiró manual o mecánicamente y se los anestesió con frío (5 minutos a 0°C) para permitir una separación efectiva de sexos o *sexado*. El uso de frío para anestesiarse a los adultos ha mostrado ser inocuo tanto en estudios del comportamiento sexual de *Drosophila melanogaster* Meigen (Barron 1999) como en pruebas de competitividad de machos de *C. capitata* (Taylor *et al.* 2001a). Una vez sexados, se les brindó agua y comida y se los mantuvo vírgenes hasta que alcanzaron la madurez sexual.

Identificación de las poblaciones o individuos

Para poder identificar a las poblaciones o moscas que se liberaron dentro de las jaulas se marcaron los individuos con una de estas dos metodologías: marcado poblacional o marcado individual. El marcado poblacional consistió en pintarle a las moscas el tórax con témpera. Para ello se las aspiró manualmente y se las colocó en una bolsa hecha de tul. Se estiró suavemente la bolsa sobre la mesa, lo cual provocó la inmovilización de las moscas, dejando el tórax de las mismas expuesto hacia arriba. Con la ayuda de un pincel, se añadió una gota de pintura al agua o témpera sobre el tórax. Cada origen o población fue identificado con un color distinto. El marcado individual consistió en

adherir una letra al tórax de la mosca. Para ello se aspiraron las moscas y se las inmovilizó con frío. Una vez inmovilizadas, se las tomó suavemente con una pinza por las alas, se las apoyó sobre el dedo índice y con otra pinza se pegó en el tórax, con la ayuda de una pintura acrílica, una letra de tipo Arial, tamaño 3, impresa en un papel de color. Esta metodología presenta ligeras modificaciones con respecto a la propuesta por McInnis *et al.* (en prensa). Se colocó a la mosca en un frasco para permitir que se seque la pintura y que se la dejó a temperatura ambiente para que se despierte. Esta metodología permitió obtener 24 moscas identificadas individualmente por cada color de papel, logrando un mayor número de categorías en comparación con el marcado poblacional. En la Figura 3.2 se puede observar una pareja en cópula donde el macho lleva marcado poblacional mientras que la hembra fue marcada individualmente.



Figura 3.2: Fotografía de una pareja en cópula donde la hembra lleva una marca individual y el macho una marca poblacional.

Jaulas de campo y condiciones experimentales

Cada jaula de campo consistió en un cilindro de 2.9 mts de diámetro y 2 mts de alto, hecho de una malla plástica por la cual no pueden escapar las moscas. Una estructura tubular de PVC permitió mantener erguida a la jaula y el acceso se realizó a través de un cierre vertical ubicado en la pared. Dos cierres ubicados en el piso permitieron alojar una planta hospedera dentro de la jaula y cerrar la abertura alrededor del tronco de la planta, evitando que se escapen las moscas. Las jaulas se instalaron en el campo experimental del IGEAF, INTA Castelar que tiene una plantación de mandarina (*Citrus*

nobilis L.). Si durante las pruebas, la temperatura ambiente era elevada, se colocó sobre la estructura de PVC y orientada hacia el Norte una tela media sombra (60%) para brindar mejores condiciones dentro de la jaula. En la Figura 3.3 se puede observar el campo experimental del IGEAF, INTA Castelar con las jaulas de campo instaladas.



Figura 3.3: Fotografía del campo experimental del IGEAF, INTA Castelar donde se realizaron las pruebas de jaula de campo. Se pueden observar 5 jaulas con los árboles frutales en su interior.

Las pruebas, metodología general

La metodología general consistió en liberar moscas dentro de la jaula y observar su comportamiento durante un determinado tiempo. Para pruebas de compatibilidad se liberaron machos y hembras de dos poblaciones en igual número. Para pruebas de recópula no fue necesario mantener esta relación ni involucrar los dos sexos de las poblaciones o líneas a analizar. Nuevamente, esto varió en función de los objetivos específicos de cada prueba. Las liberaciones se realizaron temprano a la mañana, y primero se liberaron los machos para permitir que establecieran su territorio en las arenas de cortejo y que comiencen con la emisión de feromona con la que atraieron a las hembras hacia ellos. Media hora o quince minutos más tarde se liberaron las hembras. A partir de ese momento se registraron las parejas a medida que se iban formando y se anotó el tipo de cruce del que se trataba, la ubicación dentro del árbol y la hora de inicio de la cópula. Si las moscas estaban marcadas individualmente se anotó la letra y color de cada una. Las parejas fueron suavemente introducidas en un pequeño frasco y se las

colocó a la sombra dentro de la jaula hasta que se separen, momento que se registró como la hora de finalización de la cópula. Si el objetivo era estudiar la compatibilidad para el apareamiento esa pareja era descartada o utilizada para obtener progenie, pero en ningún caso devuelta a la jaula. Si en cambio, el objetivo era analizar el comportamiento de recópula, luego de la separación se procedió a la re-liberación de las moscas dentro de la jaula. De esta forma se le permitió tanto al macho como a la hembra involucrarse en una nueva cópula. Finalizado el período de observación se retiraron todas las moscas de la jaula.

3.6 Compatibilidad Post-cigótica

El grado de compatibilidad post-cigótica entre poblaciones fue determinado estudiando el desempeño de la progenie de las cruzas híbridas en relación con las homotípicas. Esto se logró analizando la viabilidad, relación de sexos, fertilidad y fecundidad de la progenie y la viabilidad y relación de sexos de la generación siguiente, ya sea a través de retrocruzas o del seguimiento hasta una F2. El primer paso consistió en la obtención de las parejas, luego de la progenie de las mismas y por último el seguimiento por una generación más.

Obtención de parejas

Las parejas se obtuvieron a partir de las cruzas producidas en las pruebas de compatibilidad para el apareamiento, o realizando cruzas dirigidas en el laboratorio. Las parejas recuperadas de las pruebas de compatibilidad para el apareamiento fueron colocadas con agua y comida una vez que finalizó la cópula y siempre se tuvo la precaución de no exponer los frascos al sol directo. En las cruzas dirigidas, se colocaron en un frasco (3 lts.) 50 machos y 50 hembras de las poblaciones correspondientes a la craza que se quería obtener. A medida que se iban formando las parejas se las retiró del frasco y se las colocó en un frasco (300 cm³) con agua y comida. Otra alternativa consistió en colocar un macho y una hembra en un frasco con agua y comida y dejarlos una semana para que copularan libremente. Pasado este tiempo, se obtuvieron los huevos.

Identificación de cruzas y familias

Una vez obtenida la pareja, la misma recibió un número de familia que se asentó en el registro de cruzas del IGEAF, INTA Castelar. Este número fue utilizado para hacer referencia a una familia particular. Cuando se mencionó el tipo de cruce, en todos los casos, la primera letra indicó el origen de la población o línea de la cual provino el macho, y la segunda letra el origen de la población o línea de la cual provino la hembra.

Obtención de la progenie

En cada frasco se colocó una fruta plástica para obtener los huevos. Dependiendo de cada caso, las hembras fueron expuestas a fruta plástica entre dos y seis veces. Los huevos fueron retirados de la fruta con el mismo procedimiento descrito anteriormente y se los colocó sobre un recipiente de 25 ml. con dieta para larvas. El recipiente fue colocado en un frasco con un piso de vermiculita y acondicionado en la sala de larvas para permitir el desarrollo embrionario y larvario. Luego de cinco días se retiró el recipiente del frasco y con la ayuda de una lupa estereoscópica se contabilizaron los huevos no eclosionados y los huevos eclosionados. Se permitió completar el desarrollo por aproximadamente diez días más. Pasado ese tiempo se tamizó la vermiculita y se contó el número de pupas. Las pupas fueron acondicionadas para permitir la emergencia de adultos. Una vez que esta se produjo se contó el total de machos y hembras emergidos.

Viabilidad y relación de sexos de la progenie

La viabilidad de todo el desarrollo se calculó como el número de adultos emergidos en relación con el número de huevos colectados. Para cada hembra, se determinó un valor de viabilidad en cada oportunidad que puso diez o más huevos y para el análisis se consideró el valor máximo dentro de todas las colectas. Para cada estadio particular se estimó la viabilidad como el número de individuos que alcanzaron ese estadio en relación con el número que había alcanzado el estadio anterior.

La relación de sexos de la progenie se estimó como el número de machos sobre el total de adultos emergidos. Se sumaron los individuos emergidos en todas las colectas de huevos de cada hembra. Para el análisis se consideraron sólo aquellas hembras que dejaron un total de diez o más descendientes.

Fecundidad de la progenie, viabilidad y proporción de sexos de las retrocruzas o de la F2

Para poder analizar la fertilidad de ambos sexos y la fecundidad de las hembras, o si la progenie portaba algún tipo de anomalía que se manifieste en una generación siguiente, se realizó el seguimiento hasta dicha generación ya sea a través de una retrocruza con uno de los parentales o simplemente cruzando los machos con las hembras de la progenie de la primera generación hasta obtener una segunda generación. Para ello se colocaron en un frasco con agua y comida, cinco machos o hembras híbridos (o progenie de las cruza) con cinco hembras o machos de uno de los parentales, en el caso de las retrocruzas, o cinco machos y cinco hembras híbridas. Se colectaron huevos y se obtuvo la progenie para determinar la relación de sexos. La fecundidad media (f_m) por juntada de cada hembra de la progenie fue estimada como

$$f_m = a / (5 \cdot j)$$

Donde 'a' es el número total de adultos emergidos y 'j' es el número de veces en que se juntaron huevos. Asimismo, las hembras fueron preservadas en alcohol 70% para realizar disecciones y determinar el grado de desarrollo gonadal.

Desarrollo gonadal

El desarrollo gonadal en las hembras de los tefrítidos es muy conspicuo (Williamson 1989) y es posible observar la presencia de óvulos maduros dentro de las ovarias que conforman los ovarios. El proceso de maduración de los oocitos es constante y una vez que las hembras maduraron sexualmente se observan huevos maduros en los ovarios de las mismas. Es posible entonces, inferir algún tipo de anomalía, o infertilidad, cuando se

encuentran hembras que por su edad se las considera sexualmente maduras sin huevos en sus ovarios.

Para determinar la presencia, o no, de anomalías en las cruza híbridas, se practicaron disecciones ventrales en las hembras y se observó la morfología de los ovarios. Se clasificó a los mismos como normales (N) si contaron con al menos un huevo maduro o anormales (A) si no presentaron huevos maduros en ninguna de sus ovariolas (Figura 3.4). Además, se utilizaron las descripciones de ovarios anormales presentadas en Schaefer *et al.* (1979), Williamson (1989), y Torti *et al.* (1994). Se determinó la morfología tanto a lupa como en el microscopio de ovarios normales con distinto grado de madurez (Figura 3.4). Para ello se eligió una línea donde no se detectaron hembras maduras con ovarios anormales, y se fijaron en alcohol, y luego disectaron, hembras con distinta edad. De esta forma, se conoció la morfología normal a lo largo del proceso de maduración del ovario. Cada hembra fue asignada a una de estas categorías: hembra con ambos ovarios normales (NN), hembras con atrofia unliteral, es decir NA (ovario derecho normal e izquierdo atrofiado) o AN (derecho atrofiado, izquierdo normal), o hembra con atrofia bilateral o AA (ambos atrofiados). Para cada familia se revisaron las cinco hembras utilizadas para la obtención de la F2. Los ovarios atrofiados se colocaron sobre un portaobjetos con orceína acética y se los observó al microscopio. Se verificó la presencia de germarios y estadios primarios de la oogénesis para confirmar que el tejido fuera gonadal. En aquellas familias que presentaron muchos casos de ovarios atrofiados, se realizaron preparados sólo en algunos de ellos. Los restantes se conservaron en alcohol 70%.

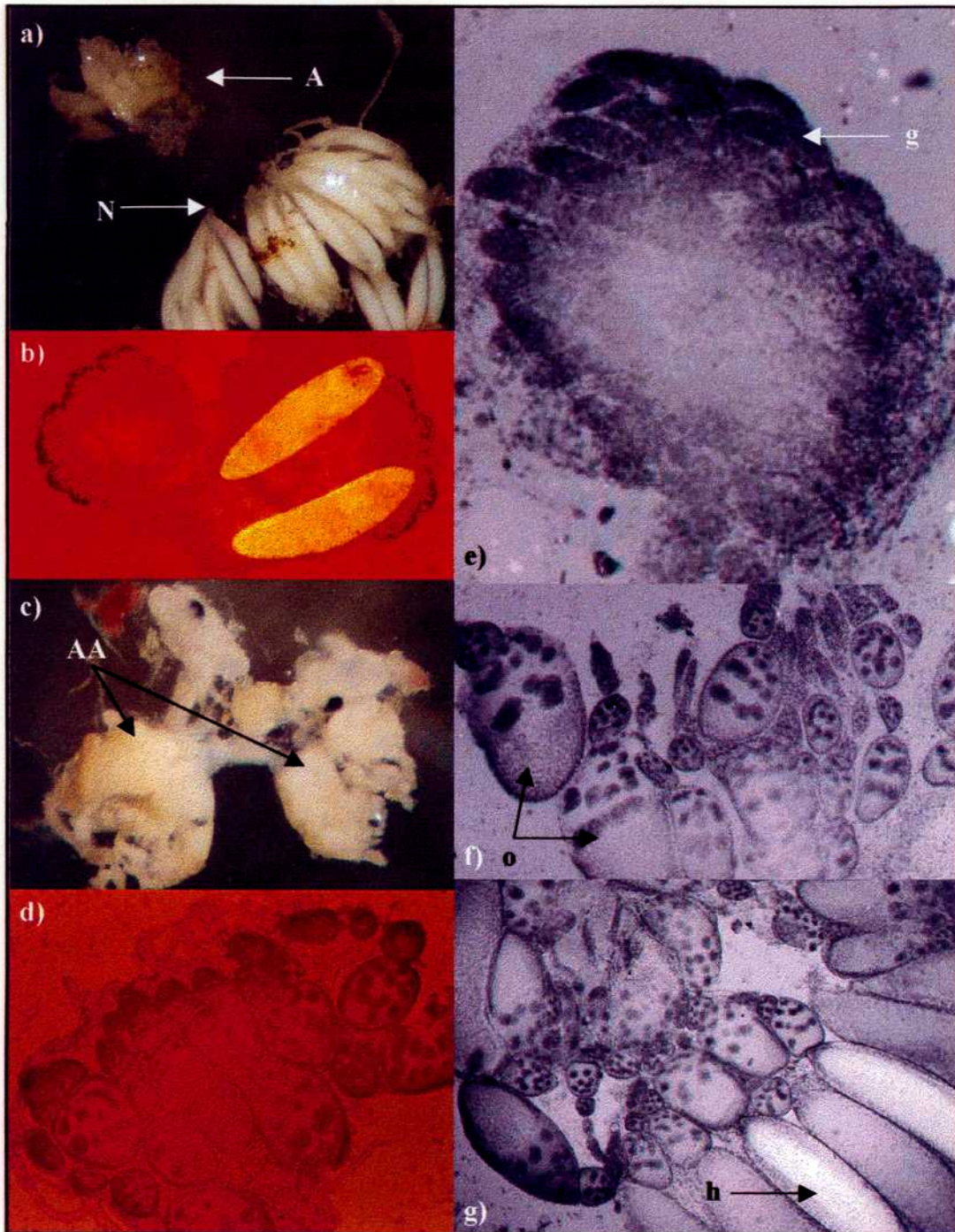


Figura 3.4: Ovarios con distinto tipo de desarrollo. **a)** Ovario normal (N) y atrofiado (A) de una hembra AN (10X). **b)** Ovarios de una hembra AN donde el ovario normal tiene sólo dos huevos maduros (40X). **c)** Ovarios de una hembra AA (20X). **d)** Ovario anormal (100X). **e)** Ovario de una hembra de un día de edad, se observan sólo germarios (g) (100X). **f)** Ovario de una hembra de tres días de edad, se observan ovariolas (o) madurando (100X). **g)** Ovario de una hembra de más de cinco días de edad, se observan huevos maduros (h) (100X).

4. Compatibilidad para el apareamiento

4.1 Introducción

Dentro de las distintas etapas que deben completar los individuos para llegar a dejar descendencia viable y fértil, y, por lo tanto, garantizar su éxito reproductivo, la cópula es la primera que se presenta una vez alcanzada la madurez sexual. En esta etapa los individuos buscan que sus gametas se encuentren con las del sexo opuesto. Generalmente, la pérdida de unas gametas en el macho no afecta su éxito reproductivo mientras que lo mismo no sucede en las hembras (Trivers, 1972). Por lo tanto, ellas deben ser muy selectivas al momento de elegir al macho que aportará el espermatozoides que fecundará esos óvulos tan costosos de producir en términos energéticos (Thornhill y Alcock, 1983). Esta inversión diferencial genera un conflicto entre sexos, los machos tienden a aparearse tantas veces como puedan y las hembras buscan las mejores gametas. El marco teórico que discute estos conceptos y que trata de explicar la aparición del dimorfismo sexual en caracteres no relacionados directamente con los órganos reproductores es el de la Selección Sexual. Esta teoría fue propuesta por Darwin (1871) y desde entonces ha crecido como un cuerpo teórico fundamental dentro de la biología evolutiva (Andersson e Iwasa, 1996, Parker y Partridge 1998, Civetta y Singh 1999, Doncaster *et al.* 2000). Muchos autores incluso han propuesto que existe un continuo entre la misma y los mecanismos de aislamiento pre-cigóticos, en especial los de tipo etológico (Boake *et al.* 1997, Civetta y Singh 1999). Para poder analizar la compatibilidad para el apareamiento en *Ceratitidis capitata* y ver las posibles implicancias para la TIE, es necesario presentar ciertos conceptos de esta teoría y conocer los patrones generales del sistema de apareamiento de esta especie.

La Selección Sexual sólo actúa sobre aquellos caracteres que afectan el éxito en el apareamiento, los cuales pueden dividirse en dos grupos: aquellos implicados en las luchas y competencias entre individuos de un mismo sexo, o Selección Intrasexual, y aquellos implicados en la capacidad para atraer y ser aceptado por los individuos del otro sexo, o Selección Intersexual (Partridge y Halliday 1984). Actualmente, algunos

autores extendieron el campo de acción de la selección sexual a caracteres involucrados en procesos posteriores al apareamiento generando el campo teórico de la selección sexual post-copulatoria o elección críptica por parte de la hembra (Eberhard y Cordero 1995, Eberhard 1996).

La elección de apareamiento que realiza la hembra no siempre implica un rol protagónico por parte de la misma. Cuando dicha elección se basa en la aceptación de un macho que, por ejemplo, ocupa un lugar determinado o emite una señal dentro de los límites de percepción sensorial de la hembra, se puede decir que la hembra ha realizado elección de pareja pasiva. En este tipo de elección, la hembra no realiza un censo de todos los machos disponibles, sino que acepta a aquél que luego de competir en forma intrasexual ocupa una determinada jerarquía o posición (Whittier y Kaneshiro 1995). Si la elección implicó verdaderamente el escrutinio de todos los machos, entonces se puede decir que fue una elección de pareja activa. La elección de apareamiento se basa muchas veces en patrones del cortejo relacionados con el sistema de apareamiento de cada especie particular. Se entiende por sistema de apareamiento al conjunto de estrategias, comportamientos y adaptaciones fisiológicas que se observan en una especie con el fin de reproducirse (Vehrencamp y Bradbury 1984). Los sistemas de apareamiento presentan una gran diversidad de formas, tanto entre especies como dentro de las mismas (Emlen y Oring 1977, Vehrencamp y Bradbury 1984).

Existen pruebas de diferencias geográficas en patrones del comportamiento sexual en distintos grupos de insectos (Foster 1999 para una revisión), como ser la propensión a la cópula en machos de *Drosophila simulans* (Carracedo *et al.* 1993, 1998), llegando incluso a casos de aislamiento etológico unidireccional entre poblaciones de *Drosophila melanogaster* (Wu *et al.* 1995). Esto último fue reportado en ausencia de aislamiento post-cigótico, sugiriendo que el aislamiento etológico no siempre surge como refuerzo de un aislamiento post-cigótico ya actuante (Fisher 1930, Dobzhansky 1937, 1940). Boake *et al.* (1997) sugirieron que el aislamiento etológico forma un continuo con la selección sexual (ver Kaneshiro 2000 para una revisión). Este tipo de aislamiento podría producirse por la discriminación que hacen las hembras contra machos de otras especies mientras que en la selección sexual se describe el apareamiento diferencial (éxito) entre

machos de una misma especie, generalmente mediada por la elección de pareja por parte de la hembra, ya sea pasiva o activa.

Ceratitis capitata presenta un sistema de apareamiento tipo *lek* (Prokopy y Hendrichs 1979, Field *et al.* en prensa). Un *lek* implica el agrupamiento de varios machos que se juntan con la finalidad de atraer a las hembras a ese lugar con el único fin de copular (Emlen y Oring 1977, Vehrencamp y Bradbury 1984). En esta especie, los machos se disponen en la cara abaxial de una hoja y comienzan a emitir una feromona sexual para atraer a las hembras (Prokopy y Hendrichs 1979). Luego de la llegada de la hembra, el macho realiza un despliegue de señales acústicas y visuales (Whittier y Kaneshiro 1995) conocido como cortejo (Ferón 1962). Las hembras son muy discriminantes al momento de elegir pareja, y el éxito en el apareamiento de los machos presenta una gran variación. El valor adaptativo de este sistema de apareamiento, en *Ceratitis capitata*, podría radicar en factores concernientes a los hábitos de la hembra. Se ha observado, por ejemplo, que cuando la hembra de una especie corre altos riesgos de predación en los sitios de alimentación y su ubicación espacial es poco predecible, los machos tienden a formar *leks*. Miembros de la misma familia donde las hembras no corren esos riesgos no despliegan este sistema de apareamiento (Hendrichs *et al.* 1991).

Se ha visto en *C. capitata* que, al menos en cierta medida, tanto la selección intersuexual como la intrasexual están presentes durante la elección de apareamiento (Whittier y Kaneshiro 1995, Norry *et al.* 1999, Eberhard 2000). La falta de aptitud en los machos, para alguna de estas dos presiones de selección, puede generar la falta de compatibilidad entre poblaciones. El uso de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) en varias regiones del mundo, plantea la necesidad de determinar la posible presencia de algún tipo de incompatibilidad para el apareamiento entre poblaciones silvestres blanco de esta técnica, y entre estas y los insectos estériles empleados. Actualmente, debido a la gran demanda mundial de insectos estériles, muchas biofábricas comenzaron a exportar sus productos a otros países incluso en distintos continentes. Estos machos estériles deben competir con machos de poblaciones silvestres que explotan distintos ambientes, provenientes de distintos orígenes geográficos y probablemente con distintas historias de colonización. Asimismo, el uso extendido de las líneas de sexado genético

(LSG), hace que muchas biofábricas produzcan la misma cepa, resultando nuevamente en el uso de una misma línea en distintos países o poblaciones blanco. Estas líneas son originadas a partir de material muchas veces lejano a las poblaciones que se quieren combatir. Si bien se trata de incorporar material genético de dichas poblaciones en las LSG, a través de retrocruzas, este procedimiento no siempre da buenos resultados (Pereira, com. pers., Franz, citado en Cayol 2000a). Determinar la compatibilidad para el apareamiento se vuelve, entonces, crucial para una buena práctica de la TIE.

Muchos autores desarrollaron índices para medir el grado de compatibilidad entre las poblaciones a partir del número de cópulas obtenidas para cada tipo de combinación de cópulas posibles bajo distintos diseños experimentales (Stalker 1942, Bateman 1949, Levene 1949, Merrel 1950, Barker 1962, Bishop *et al.* 1975, Chambers *et al.* 1983). En el caso particular de estudios de compatibilidad entre distintas poblaciones de *Ceratitidis capitata*, se utilizaron modificaciones de índices ya publicados (Chambers *et al.* 1983) y se propusieron nuevos (McInnis *et al.* 1996, Cayol *et al.* 1999). Dos de ellos son: el Índice de Aislamiento Relativo o *Relative Isolation Index (RII)* propuesto por McInnis *et al.* (1996), y el Índice de Aislamiento Sexual o *Index of Sexual Isolation (ISI)* propuesto por Cayol *et al.* (1999), y se calculan de la siguiente forma:

$$RII = (X_{AA} \cdot X_{BB}) / (X_{AB} \cdot X_{BA})$$

$$ISI = [(X_{AA} + X_{BB}) - (X_{AB} + X_{BA})] / (X_{AA} + X_{BB} + X_{AB} + X_{BA})$$

Donde, X_{AB} representa el número de parejas obtenidas entre machos de la población A y hembras de la población B y así para todas las combinaciones posibles. El RII oscila de 0 a ∞ y un valor de 1 indica apareamiento al azar. Valores menores a uno indican apareamiento clasificado negativo, donde el número de apareamientos heterotípicos es mayor al de los homotípicos. Valores mayores a uno indican apareamiento clasificado positivo (McInnis *et al.*, 1996). Por otro lado, el ISI oscila entre -1 y +1, donde -1 indica apareamiento clasificado negativo, +1 apareamiento clasificado positivo y cero apareamiento al azar (Cayol *et al.*, 1999). En los casos donde algunas de las cruza heterotípicas toma valores de cero, el RII puede ser corregido de la siguiente forma:

$$RIIc = \sqrt{((X_{AA} + 1) \cdot (X_{BB} + 1) / (X_{AB} + 1) \cdot (X_{BA} + 1))}$$

Asimismo, existen índices que estiman el desempeño o *performance* de los machos o hembras de una población en relación con los machos o hembras de la otra. Estos índices, propuestos por Cayol *et al.* (1999), son el Índice del Desempeño Relativo del Macho o *Male Relative Performance Index (MRPI)* y el Índice del Desempeño Relativo de la Hembra o *Female Relative Performance Index (FRPI)* y se calculan de la siguiente forma:

$$MRPI = [(X_{AA} + X_{AB}) - (X_{BA} + X_{BB})] / (X_{AA} + X_{AB} + X_{BA} + X_{BB})$$

$$FRPI = [(X_{AA} + X_{BA}) - (X_{AB} + X_{BB})] / (X_{AA} + X_{AB} + X_{BA} + X_{BB})$$

Donde, X_{AB} representa lo mismo que antes. El MRPI permite tener una idea de las diferencias relativas en el éxito o desempeño para el apareamiento entre los machos de una población con respecto a los machos de la otra. El FRPI permite tener una idea de la diferencia en la actividad y receptividad entre las hembras de dos poblaciones o líneas. Ambos índices, al igual que el ISI, oscilan entre -1 y +1. Valores cercanos a 1 indican una mayor participación de los machos (MRPI) o de las hembras (FRPI) de la población A, mientras que valores cercanos a -1 señalan una mayor participación de los machos, o hembras, de la población B. Valores cercanos a cero indican que ambas líneas están igualmente involucradas en las cópulas alcanzadas.

Distintos tipos de estudios fueron propuestos para determinar la calidad general del insecto criado (Boller y Chambers 1977, Boller *et al.* 1981), la habilidad para la cópula y la capacidad de inducir esterilidad (Haisch 1970, Fried 1971). Más recientemente el uso de ensayos en condiciones semi-naturales, como las pruebas de jaula de campo, permitió evaluar la habilidad de los machos de laboratorio para alcanzar la cópula en condiciones parecidas a las que se presentan en el campo (Prokopy y Hendrichs 1979, Calkins y Webb 1983, Chambers *et al.* 1983, Zapien *et al.* 1983). Estas pruebas representan, hoy en día, la mejor alternativa para evaluar la calidad de los insectos de cría y son utilizadas rutinariamente en tests de control de calidad en biofábricas (IAEA 1998) y para evaluar nuevas líneas (Robinson *et al.* 1986, Cladera *et al.* 2002).

Asimismo, estas pruebas han sido extendidas a estudios de compatibilidad entre poblaciones (McInnis *et al.* 1996, Cayol *et al.* 1999, Cayol 2000a, Rendon *et al.* 2000) y son empleados en distintas líneas de investigación del comportamiento sexual. (McInnis 1996, Cayol *et al.* 1999, Cayol 2000a, Lance *et al.* 2000, Cladera *et al.* 2002, McInnis *et al.* en prensa).

Con el objeto de determinar el grado de compatibilidad para el apareamiento entre dos poblaciones silvestres y entre distintas poblaciones silvestres y una línea de laboratorio se analizó el comportamiento sexual de individuos liberados en jaulas de campo.

4.2 Material y métodos

Material biológico.

La línea de laboratorio utilizada fue la Arg17y-80 y las poblaciones silvestres fueron: Sáenz Peña (SP), Reconquista (Re), Concordia (Con) y Santa Rosa (SR), caracterizadas en la sección 3.4 (Material y Métodos). No se realizaron modificaciones en los procedimientos seguidos para obtener las pupas y adultos vírgenes, sexualmente maduros, a los descritos en la sección 3.1 (Material y Métodos). Se colocaron 50 individuos por frasco (3 lts), y un día antes de las pruebas se los marcó con tempera en el tórax y se los colocó en frascos del mismo tamaño en una densidad de 30 individuos/frasco con agua y comida.

Pruebas de jaulas de campo.

Se realizaron dos tipos de pruebas en jaulas de campo. En una se confrontaron dos poblaciones silvestres, SP y Re. En la otra se confrontaron, de una en una, distintas poblaciones silvestres con la línea Arg17y-80.

SP x Re. Se liberaron 50 machos SP y 50 machos Re a las ocho de la mañana y quince minutos más tarde 50 hembras de cada origen. Cuando el material lo permitió se reemplazaron aquellos individuos muertos o débiles. Durante cinco horas de observación, a medida que las parejas se iban formando, se registró el tipo de cruce del que se trataba, la hora de inicio y la ubicación de la pareja. Las

parejas fueron retiradas y colocadas en frascos (200 ml) a la sombra hasta que completaron la cópula, registrándose la hora de finalización. Se realizaron dos repeticiones en enero de 1998.

Silvestre x Arg17y-80. En este caso, se liberaron 50 machos de una de las poblaciones silvestres y 50 machos de Arg17y-80 a las ocho de la mañana. Quince minutos más tarde se liberaron 50 hembras de cada origen y se procedió de igual forma que en el caso anterior. Las poblaciones silvestres estudiadas fueron SP, Re, Con y SR. Se realizaron dos repeticiones para cada caso salvo para Con donde se realizó sólo una. SP y Re fueron analizadas en enero, Con en febrero y SR en mayo de 1998.

Análisis de datos.

Para cada repetición se calcularon el porcentaje de cópula, los índices de compatibilidad para el apareamiento (RII e ISI) y los índices de desempeño relativo de cada uno de los sexos (MRPI y FRPI). Las hipótesis a contrastar fueron las siguientes: el número de cópulas homotípicas fue igual al de cópulas heterotípicas (para el ISI), el número de cópulas que involucraron machos de la población A fue igual al de cópulas que involucraron machos de la población B (para el MRPI) y el número cópulas con hembras de la población A fue igual al de hembras de la población B (para el FRPI). La significación estadística de los índices se determinó con un test de χ^2 de Bondad de Ajuste, sumando los datos de todas las réplicas para cada combinación de poblaciones. Aquellas réplicas con porcentajes de cópula menores al 20% fueron eliminadas siguiendo lo sugerido en el Manual de Control de Calidad (IAEA 1998) para pruebas de jaula de campo. Posibles diferencias en la hora de inicio o en la duración de las cópulas atribuibles al tipo de cruce fueron analizadas a través de un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se realizaron comparaciones múltiples de Dunn cuando el ANOVA mostró diferencias entre grupos. Se analizó la posible asociación entre la ubicación de las parejas en las distintas alturas del árbol y en las distintas partes anatómicas (hoja, rama, red, etc) y el tipo de cruce mediante un test de χ^2 de Homogeneidad.

4.3 Resultados

Compatibilidad entre las poblaciones Sáenz Peña y Reconquista

En las dos repeticiones realizadas el porcentaje de apareamientos fue superior al 20% (Tabla 4.1) por lo que ninguna réplica fue descartada y se sumaron los datos de ambas jaulas para determinar la compatibilidad en el apareamiento. Se observó, en ambos casos, un mayor número de cópulas SP x SP con respecto a las otras. Los valores del Índice de Aislamiento Sexual (ISI) no difirieron de lo esperado para cópulas al azar ($\chi^2_{(1)} = 3.33$, $P = 0.068$) y el Índice del Desempeño Relativo del Macho (MRPI) mostró que el comportamiento de los machos de ambas poblaciones fue similar ($\chi^2_{(1)} = 2.70$, $P = 0.100$). Por otro lado, el Índice del Desempeño Relativo de la Hembra (FRPI) mostró en las hembras Re niveles de actividad inferiores a las hembras SP ($\chi^2_{(1)} = 4.03$, $P = 0.045$). Este desempeño menor de las hembras de Re respecto a las hembras SP fue consistente en ambas réplicas, aún cuando las diferencias fueron significativas sólo en la réplica I ($\chi^2_{(1)} = 4.09$, $P = 0.043$).

Rep.	% cópula	Tipo de Cruza				RII	ISI	MRPI	FRPI
		SP x SP	SP x Re	Re x SP	Re x Re				
I	67.1	21	10	14	10	1.50	0.13	0.13	0.28
II	65.0	24	14	12	15	2.14	0.20	0.17	0.11
Σ	-	45	24	26	25	1.73	0.16	0.16	0.17

Tabla 4.1: Porcentaje de cópula, número de parejas obtenidas para cada tipo de cruza e índices de compatibilidad para las dos réplicas de las pruebas de jaula de campo entre las poblaciones SP y Re. Σ : ambas repeticiones. RII: Índice de Aislamiento Relativo; ISI: Índice de Aislamiento Sexual, MRPI: Índice de Desempeño Relativo del Macho y FRPI: Índice de Desempeño Relativo de la hembra.

Las cópulas se iniciaron en promedio, entre las diez y las once de la mañana y se observó una tendencia hacia inicios más tardíos si la hembra era Re sin importar el origen del macho (Tabla 4.2). Sin embargo el ANOVA no mostró diferencias significativas entre los distintos tipos de cruza ($P > 0.05$). Tampoco se encontraron diferencias para la duración de las cópulas.

Tipo de cruce	Hora de Inicio	Duración
SP x SP	10:03 ± 1:01 (45)	2:44 ± 0:41 (40)
SP x Re	10:44 ± 2:07 (24)	2:47 ± 0:32 (20)
Re x SP	9:56 ± 0:55 (26)	3:04 ± 0:46 (25)
Re x Re	10:58 ± 1:52 (25)	2:38 ± 0:45 (19)

Tabla 4.2: Hora de inicio y la duración de las cópulas para todas las cruces posibles entre SP y Re. Media ± desvío estándar (N).

La mayoría de las cópulas ocurrieron en los tercios medio y superior del árbol y sólo en las cruces que involucraron hembras Re se registraron casos en el tercio inferior. La ubicación de las parejas en los tercios medio y superior fue similar para los cuatro tipos de cruce ($\chi^2_{(3)} = 3.16$, $P = 0.367$). Con respecto a la parte anatómica del árbol o jaula, las parejas se encontraron principalmente en el lado inferior de las hojas y en segundo lugar en la pared de la jaula. En este caso las parejas también se distribuyeron independientemente del tipo de cruce ($\chi^2_{(6)} = 5.82$, $P = 0.443$).

Compatibilidad entre cuatro poblaciones silvestres y Arg17y-80

En todos los casos, el porcentaje de apareamiento fue superior al 20% (Tabla 4.3) por lo que, aquí tampoco se descartaron réplicas y se sumaron los datos de las dos repeticiones para determinar la compatibilidad en el apareamiento entre cada una de las poblaciones silvestres y la línea de laboratorio Arg17y-80.

Población silvestre	Rep.	% cópula	Tipo de Cruce				RII	ISI	MRPI	FRPI
			S x S	S x L	L x S	L x L				
SP	I	67.0	11	25	14	17	0.53	-0.16	0.07	-0.25
	II	70.9	15	14	9	18	2.14	0.18	0.04	-0.14
	Σ		26	39	23	35	1.01	-0.01	0.06	-0.20
Re	I	51.0	4	13	4	30	2.31	0.33	-0.33	-0.69
	II	50.5	7	13	6	21	1.89	0.19	-0.15	-0.45
	Σ		11	26	10	51	2.16	0.27	-0.24	-0.57
SR	I	32.0	4	16	0	12	1.96	0.00	0.25	-0.75
	II	34.0	7	11	2	14	4.46	0.24	0.06	-0.47
	Σ		11	27	2	26	5.30	0.12	0.15	-0.61
Con	I	42.1	8	11	3	18	4.36	0.30	-0.05	-0.45

Tabla 4.3: Porcentaje de cópula, número de parejas obtenidas para cada tipo de cruce e índices de compatibilidad para las pruebas de jaula de campo entre poblaciones silvestres (S) y la línea de laboratorio Arg17y-80 (L). Σ: ambas repeticiones. RII: Índice de Aislamiento Relativo; ISI: Índice de Aislamiento Sexual, MRPI: Índice de Desempeño Relativo del Macho y FRPI: Índice de Desempeño Relativo de la Hembra.

Los índices de compatibilidad RII e ISI mostraron que las poblaciones presentaron un comportamiento distinto (Tabla 4.3). Mientras que en SP el nivel de compatibilidad fue alto, las otras poblaciones mostraron cierta tendencia hacia el aislamiento etológico con Arg17y-80. Sin embargo, el análisis de χ^2 de Bondad de Ajuste mostró que sólo la población Re presentó un ISI significativamente distinto a cero ($\chi^2_{(1)} = 6.89$, $P = 0.009$).

Con respecto a la participación de los machos, los valores de MRPI obtenidos mostraron, en SP y Con, que el desempeño fue igual para machos silvestres y de laboratorio. En SR se observó una tendencia hacia un mayor número de cópulas si el macho era silvestre, pero las diferencias no fueron significativas. En Re los machos de laboratorio mostraron un desempeño significativamente mayor que los machos silvestres ($\chi^2_{(1)} = 5.88$, $P = 0.015$).

Con respecto a las hembras, en todos los casos, la participación de las hembras de laboratorio fue significativamente mayor a la de las hembras silvestres. Esto lo muestran los valores de FRPI menores a cero y los valores de χ^2 para las cuatro poblaciones ($\chi^2_{(1)} = 5.08$, $P = 0.024$ para SP; $\chi^2_{(1)} = 32.0$, $P < 0.0001$ para Re; $\chi^2_{(1)} = 24.24$, $P < 0.0001$ para SR; y $\chi^2_{(1)} = 8.10$, $P = 0.004$ para Con). Las hembras SR y Con se aparearon en mayor proporción con machos silvestres que con machos de laboratorio. Estas diferencias fueron significativas para las hembras SR (Bondad de Ajuste a igual preferencia, $\chi^2_{(1)} = 6.23$, $P = 0.013$) pero no para Con. Por su parte, las hembras SP y Re se aparearon en igual proporción con los dos tipos de machos. Con respecto a las hembras de laboratorio, en las pruebas con Re, se observó una mayor proporción de cruzas homotípicas (Bondad de Ajuste, $\chi^2_{(1)} = 8.12$, $P = 0.004$).

La hora de inicio de las cópulas estuvo asociada al tipo de cruce para SP, Re y Con (Tabla 4.4). El ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis resultó significativo para las tres pruebas ($H_{(3)} = 17.57$, $P < 0.001$ para SP; $H_{(3)} = 11.28$, $P = 0.010$ para Re; y $H_{(3)} = 9.58$, $P = 0.023$ para Con). Para SP, se observó que las cruzas Arg17y-80 x SP comenzaron más tarde que las cruzas SP x SP y SP x Arg17y-80. Si bien las diferencias con las cruzas Arg17y-80 x Arg17y-80 fueron no significativas la tendencia fue la misma que para los otros casos. En la prueba Re se observó un comportamiento similar.

La cruce Arg17y-80 x Re se inició más tarde que cualquiera de las otras y difirió en forma estadísticamente significativa de las cruces Arg17y-80 x Arg17y-80 y Re x Arg17y-80. Para Re x Re la tendencia fue similar, si bien no se detectaron diferencias significativas. Con respecto a Concordia, el único par que mostró diferencias significativas fue el de las cruces Con x Arg17y-80 y Arg17y-80 x Arg17y-80.

La duración de las cópulas, mostró diferencias asociadas al tipo de cruce (Tabla 4.4). En este caso, el ANOVA resultó significativo para SP ($H_{(3)} = 14.93$, $P = 0.002$), para Re ($H_{(3)} = 13.26$, $P = 0.004$) y para Con ($H_{(2)} = 6.18$, $P = 0.046$). En SP, las cruces Arg17y-80 x SP duraron menos que cualquiera de las otras tres, mientras que en Re, las cópulas Re x Re fueron más cortas que las cópulas Arg17y-80 x Arg17y-80. En el caso de Con, cuando se realizaron las comparaciones múltiples no se detectaron diferencias entre los distintos pares de grupos.

		Población Silvestre			
Cruza		SP	Re	Con	
Hora de Inicio	S x S	10:00 ± 1:45 (26) a	11:01 ± 3:07 (11) ab	9:19 ± 0:51 (8) ab	
	S x L	9:25 ± 0:53 (39) a	10:03 ± 1:39 (25) a	8:46 ± 0:37 (11) a	
	L x S	11:23 ± 1:49 (23) b	12:26 ± 1:39 (10) b	10:43 ± 1:33 (3) ab	
	L x L	10:05 ± 1:27 (35) ab	10:26 ± 1:45 (51) a	9:58 ± 1:26 (18) b	
Duración	S x S	3:31 ± 0:52 (24) a	2:35 ± 0:18 (7) a	3:49 ± 0:35 (8) a	
	S x L	3:32 ± 0:51 (39) a	3:28 ± 1:00 (22) ab	4:35 ± 0:43 (11) a	
	L x S	2:23 ± 1:10 (18) b	2:37 ± 0:35 (4) ab	3:40 ± 0:21 (2) -	
	L x L	3:30 ± 1:08 (31) a	3:28 ± 0:43 (43) b	3:50 ± 0:51 (14) a	

Tabla 4.4: Hora de inicio y la duración de la cópula para todas las cruces posibles en las pruebas entre una población silvestre (Sil) y la línea de laboratorio Arg17y-80 (Lab). Media ± desvío estándar (N). Para cada variable dentro de cada prueba, los valores seguidos de una misma letra no difieren según el test de Dunn ($P > 0.05$).

Para las jaulas con individuos SR, se analizaron posibles diferencias entre las cruces SR x Arg17y-80 y Arg17y-80 x Arg17y-80 y no se detectaron diferencias tanto para inicio como para duración entre estos dos pares (test de Mann-Whitney, $P > 0.05$). Las otras cruces estuvieron representadas por muy pocos individuos por lo que no se las incluyó en el análisis.

Las parejas se ubicaron dentro de la jaula de acuerdo con el tipo de cruce del que se tratara. Las cópulas que involucraron individuos silvestres se ubicaron en las partes media y alta del árbol mientras que las que involucraron individuos Arg17y-80 se

ubicaron en mayor proporción en la parte baja. La ubicación de las cruzas SP x Arg17y-80 y Arg17y-80 x Arg17y-80, difirieron en forma estadísticamente significativa ($\chi^2_{(2)} = 8.89, P = 0.012$). Para Re x Arg17y-80 y Arg17y-80 x Arg17y-80 las diferencias no fueron significativas ($\chi^2_{(2)} = 5.40, P = 0.067$). En Con el número total de parejas fue bajo por lo que no se realizó un análisis estadístico de la altura en la que se encontraron las parejas. Sin embargo, es importante mencionar que sólo la craza Arg17y-80 x Arg17y-80 presentó parejas en el tercio inferior. Con respecto a la parte anatómica del árbol o jaula, las parejas se encontraron principalmente en el lado inferior de las hojas, y en SP y Con se observó una mayor proporción de parejas de la craza Arg17y-80 x Arg17y-80 en la red con respecto a otras cruzas.

4.4 Discusión

En este capítulo se buscaron evidencias de aislamiento etológico o de falta de compatibilidad para el apareamiento entre dos poblaciones silvestres y entre cuatro poblaciones silvestres y una línea de laboratorio con muchos años bajo cría artificial.

Los valores de los índices de compatibilidad calculados para las pruebas entre las poblaciones Sáenz Peña (SP) y Reconquista (Re) permiten concluir que no existen evidencias de aislamiento en el apareamiento entre estas dos poblaciones silvestres. Este hecho se ve reflejado tanto en el número de cópulas alcanzadas para cada tipo de craza como en el patrón de actividad de los individuos. Las cópulas se iniciaron a la misma hora y duraron lo mismo para las cuatro combinaciones posibles de cruzas, y las parejas se ubicaron a la misma altura y en la misma parte anatómica del árbol.

En forma simultánea a la realización de esta tesis, otro autor analizó la compatibilidad para el apareamiento, entre algunas de las combinaciones posibles, entre poblaciones silvestres de Guatemala, Kenia, Israel, Australia, Grecia, la isla Reunión y las islas de Madeira, Portugal (Cayol 2000a). Los resultados obtenidos en dicho estudio mostraron la total compatibilidad entre orígenes y permitieron concluir que bajo las condiciones de observación que permiten los estudios en jaulas de campo, no es posible detectar cambios en el comportamiento sexual que señalen un aislamiento pre-cigótico incipiente

entre poblaciones. La pérdida de variabilidad genética asociada a los procesos de colonización de nuevos ambientes y habitats (ver Bonizzoni *et al.* 2000 y las citas que allí se mencionan) parece no afectar significativamente el comportamiento sexual. Este hecho se ve confirmado por los resultados obtenidos en los estudios detallados del comportamiento sexual, principalmente del cortejo de los machos, de distintas poblaciones silvestres de todo el mundo (Lux *et al.* en prensa).

Cuando se analizó la compatibilidad entre distintas poblaciones silvestres y la línea Arg17y-80, se obtuvieron los cuatro tipos de cruzas posibles para cada población, sugiriendo que las poblaciones silvestres se aparean libremente con esta línea de laboratorio. Sin embargo, se detectaron ciertas diferencias en la proporción de cada tipo de cruce, evidenciando la presencia de cierto grado de incompatibilidad pre-cigótica, principalmente de tipo etológico, o actividad diferencial entre orígenes. En las jaulas con moscas de Sáenz Peña (SP), los valores de los índices de compatibilidad, RII e ISI, fueron congruentes y mostraron absoluta compatibilidad entre SP y Arg17y-80. En las pruebas con individuos de Santa Rosa (SR), los dos índices no coincidieron. El valor de RII fue elevado, sugiriendo cierto grado de incompatibilidad, mientras que el ISI no mostró esta tendencia. En Reconquista (Re), sucedió lo opuesto, el RII indicó buena compatibilidad entre los dos orígenes mientras que el ISI fue significativamente mayor a cero, sugiriendo la ocurrencia de apareamiento clasificado positivo o exceso de apareamientos homotípicos. En Concordia (Con), al igual que en SP, los índices fueron congruentes, pero en este caso mostraron una tendencia hacia la incompatibilidad, si bien la misma fue no significativa. La discrepancia entre los dos índices de compatibilidad proviene de la diferencia en el cálculo de los mismos, el RII es multiplicativo mientras que el ISI es aditivo (discutido con mayor detalle en Cayol *et al.* 1999). Esto muestra que para poder analizar en forma completa la compatibilidad es necesario utilizar ambos índices y complementarlos con los índices de desempeño relativo.

El FRPI, mostró en todos los casos que las hembras de la línea Arg17y-80 presentaron niveles de actividad superiores a las hembras silvestres, sugiriendo mayor receptividad para la cópula. Esta alta receptividad en hembras de laboratorio es un hecho que ha sido

informado, en *C. capitata*, tanto en experimentos realizados en el laboratorio como en jaulas de campo (ver Eberhard 2000 y Cayol 2000b para una revisión) y muestra como las condiciones de cría ejercen presiones de selección (Roush y Hopper 1995). Las implicancias de estas presiones deben ser consideradas en el marco de la TIE. En este caso, la baja selectividad de la hembra podría favorecer el desarrollo de machos poco atractivos para las hembras silvestres, generado por un proceso evolutivo de tipo fisheriano (Briceño y Eberhard 2000). Estas hembras no mostraron una elección diferencial del macho en las pruebas con las poblaciones SP, Con y SR. Sin embargo, en las pruebas con Re se observó una tendencia hacia un mayor número de cópulas homotípicas (Arg17y-80 x Arg17y-80), sugiriendo cierto grado de aislamiento como se mencionó anteriormente. Con respecto al comportamiento de las hembras silvestres, la preferencia por machos silvestres observada en hembras SR y Con sugiere la presencia de un cierto grado de aislamiento. Sin embargo, estos resultados provienen de casos donde el desempeño de las hembras silvestres fue pobre, aún con machos de su mismo origen. Para poder concluir que estas hembras prefieren machos de su misma población en vez de machos del laboratorio sería necesario aumentar el número de repeticiones.

En todos los casos se observó la misma tendencia con respecto a la hora en que se iniciaron las cópulas. Las primeras en iniciarse involucraron machos silvestres y hembras Arg17y-80, y las últimas, machos Arg17y-80 y hembras silvestres. Aún cuando dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas en todos los casos, este hecho puede ser considerado como otra evidencia de que las hembras silvestres prefieren no aparearse con machos de laboratorio y de que los machos de laboratorio son menos competitivos que los machos silvestres. El diseño experimental de estas pruebas de compatibilidad no contempló la reposición de individuos a medida que se iban formando las cópulas. Esto genera un déficit de individuos sexualmente activos y exitosos. En este caso la alta receptividad de las hembras de laboratorio, junto a las cópulas entre machos y hembras silvestres, redujeron el número de machos silvestres potencialmente exitosos dentro de las jaulas, sugiriendo que las hembras silvestres que se aparearon con machos de laboratorio lo hicieron más tarde que las que se aparearon con machos silvestres porque no quedaban machos exitosos con los que copular. Por otra parte, los machos silvestres fueron los primeros en conseguir pareja ya que,

probablemente, fueron capaces de ocupar un lugar principal dentro de los *leks* así como de desplegar un cortejo exitoso. Las hembras del laboratorio, al ser las más receptivas fueron las primeras en aparearse con dichos machos. Esta cruce reunió, por lo tanto, a los machos más competitivos con las hembras más receptivas, la otra cruce reunió a los machos menos competitivos con las hembras más selectivas. La composición de ambas cruces podría entonces explicar las diferencias en las horas de inicio de las cópulas. Sin embargo, no se debe descartar un cierto efecto del ambiente ya que la hora de inicio de las cópulas muestra mucha variación entre distintas regiones del mundo (ver Eberhard 2000 para una revisión), y la forma en que se ordenaron las horas medias de inicio entre los distintos tipos de cruces puede incluso ser distinta a la observada en este caso (Lance *et al.* 2000).

Los resultados presentados aquí, no son el primer ejemplo donde los machos de laboratorio son discriminados por hembras de una población silvestre. McInnis *et al.* (1996) reportó valores de RII cercanos a 30 para una población en las islas de Hawai enfrentada a moscas de una línea (HI-Lab) con más de 30 años bajo cría artificial. Este hecho fue presentado como un caso de resistencia en el comportamiento o *behavioral resistance* a la TIE, semejando la resistencia que presentan algunos insectos a los insecticidas y significó el primer alerta sobre las consecuencias de los procesos de cría en el comportamiento sexual de los machos de *C. capitata*. Otros estudios han mostrado que la cría masiva altera distintos aspectos del cortejo como la duración del mismo (Briceño y Eberhard 1998), o las señales auditivas que emite el macho con el movimiento de las alas (Briceño y Eberhard 1999).

Si bien no está todavía esclarecido cuáles son los cambios claves que llevan a una menor competitividad de los machos de laboratorio frente a los silvestres, esto es un hecho común para *C. capitata* (McInnis *et al.* 1996, Cayol *et al.* 1999, Lance *et al.* 2000). En este contexto es interesante mencionar los esfuerzos que se realizan actualmente para aumentar la competitividad, ya sea a través de un programa de selección hacia machos más competitivos (McInnis *et al.* 2002), a través de la implementación de una mejora de los machos a liberar, mediante el suministro de proteínas (Yuval *et al.* 1998, Drew y Yuval 2000) o de sustancias aromatizantes que

aumentan el éxito para la cópula (Shelly 2001), o través del estudio para determinar sistemas de cría que minimicen el deterioro que se genera dentro del laboratorio (Liedo *et al.* 2001). Más interesante aún, es el caso informado por Cladera *et al.* (2002), donde los machos de una línea de sexado genético Cast-191, desarrollada en el IGEAF, INTA Castelar, presentaron una mayor competitividad con respecto a los machos de una población silvestre. Sería sumamente interesante analizar los aspectos del cortejo de estos machos para determinar qué factores son responsables de esta superioridad y analizar también si la misma se mantiene en un amplio número de poblaciones silvestres.

Además de los efectos adversos de la cría, existen otros factores, como el proceso de esterilización o el manipuleo posterior hasta la liberación, que pueden afectar la calidad y competitividad de los machos. La radiación aplicada para lograr la esterilización puede llevar a una disminución de la actividad en general y de la búsqueda de pareja en particular (Calcagno 2001, Lux *et al.* en prensa), llegando a un menor éxito en el apareamiento de los machos irradiados en comparación con machos, de la misma cepa, no irradiados (Calcagno 2001, Cladera *et al.* 2002). Estos trabajos ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios periódicos y detallados de las cepas que se están liberando para poder detectar en forma rápida problemas de compatibilidad entre las hembras de la población que se pretende erradicar y los machos estériles. Estos estudios asimismo deben determinar si se trata de una disminución en la competitividad y, por lo tanto, se circunscriben a los insectos de cría, como lo sucedido en el caso del gusano barrenador (Makela y Richardson 1978, Richardson 1978), o si se deben a una selección preferencial de la hembra, manifestando una falta de compatibilidad originada en el campo (McInnis *et al.* 1996).

Los resultados presentados en este capítulo mostraron para SP y Re una tendencia hacia un efecto del origen de la hembra en la duración de las cópulas. En SP, las cópulas entre machos Arg17y-80 y hembras SP duraron menos que cualquiera de las otras combinaciones posibles. Este hecho podría sugerir un rechazo por parte de la hembra silvestre hacia los machos de laboratorio. Sin embargo hay que tomar esta hipótesis con cautela ya que, si bien no se sabe qué factores determinan la finalización de una cópula

(Eberhard 2000), trabajos anteriores (Cayol *et al.* 1999, Cladera *et al.* 2002, McInnis *et al.* en prensa, ver Eberhard 2000 para una revisión) y resultados presentados en otro capítulo de esta tesis (Comportamiento de recópula bajo condiciones de laboratorio, Capítulo 5.1), muestran que la duración de la misma, está fuertemente asociada al origen del macho sin registrarse ninguna asociación con el origen de la hembra. En este capítulo, asimismo, se observó una fuerte correlación entre la hora de inicio y la duración de la cópula (Correlación de Spearman, $r = -0.52$, $P < 0.001$ para todas las cópulas y en particular para Arg17y-80 x SP, $r = -0.77$, $P < 0.001$). Esta correlación puede ser considerada como una consecuencia de que la actividad sexual en esta mosca se desarrolla principalmente en las primeras horas de la mañana (Prokopy y Hendrichs 1979, Calcagno 2001, ver Yuval y Hendrichs 2000, y Eberhard 2000 para una revisión). A medida que transcurre el día, el tiempo invertido en la reproducción disminuye, y, por lo tanto, se acortan las cópulas. Como las cópulas en las cruza Arg17y-80 x SP se iniciaron más tarde que las otras, las diferencias en duración podrían estar generadas por esta asociación y no por el tipo de cruce. En las pruebas con Reconquista, las cópulas Re x Re duraron menos que las cópulas Arg17y-80 x Arg17y-80 y también se observó un posible control por parte de la hembra. La baja participación de Re en las cruza debe ser considerada como una señal de bajo estímulo para la cópula que también se podría manifestar en cópulas más cortas. La falta de diferencias estadísticamente significativas entre las cópulas Re x Arg17y-80 y aquellas que involucraron hembras Re puede ser sólo una consecuencia de las diferencias en los tamaños de las muestras de cada grupo. Es necesario poder contar con más datos de las cruza menos representadas para poder determinar si en este caso la hembra cumple un rol importante en la duración de la cópula o no.

El establecimiento de los *leks* en partes del árbol que provean un microambiente adecuado es un comportamiento reconocido en *C. capitata* (Kaspi y Yuval 1999). Las diferencias encontradas con respecto a la ubicación de las cópulas señalan que los machos de laboratorio presentan una tendencia a desplegar su comportamiento de cortejo en las partes más bajas de la jaula o el árbol, y que a esa zona sólo acuden hembras de laboratorio. Este patrón también fue observado para otras líneas de laboratorio en pruebas de jaula de campo en Guatemala y Hawai (McInnis, com. pers.).

Esto podría estar indicando una baja capacidad de vuelo por parte de las moscas de laboratorio o que cierta proporción de dichos machos no logran competir por un lugar en los *leks* que se forman en estratos superiores. Nuevamente esto debe ser tomado como otra evidencia a las ya acumuladas (Briceño *et al.* 1996, Briceño y Eberhard 1998, Calcagno 2001, ver Cayol 2000b para una revisión) de que la cría en el laboratorio produce cambios en el comportamiento de los machos que disminuyen su éxito en el apareamiento.

A pesar de las diferencias encontradas en este experimento entre moscas de laboratorio con muchos años bajo cría artificial y aquellas provenientes de poblaciones silvestres, no se detectaron fuertes evidencia de aislamiento ni de falta de compatibilidad. Si bien las hembras de laboratorio mostraron una mayor receptividad y los machos de laboratorio una disminución en la competitividad que los individuos silvestres, se obtuvieron los cuatro tipos de cruzas posibles. Esto muestra que la línea Arg17y-80 todavía es compatible para el apareamiento con distintas poblaciones de Argentina después de más de 20 años bajo de su introducción al laboratorio.

Para poder determinar el verdadero impacto de la cría en el laboratorio sobre la compatibilidad y el éxito reproductivo de los individuos es necesario, sin embargo, analizar todas las etapas involucradas. Alcanzar la cópula no garantiza la transferencia de esperma, ni la fertilización de los huevos, y mucho menos la viabilidad y fertilidad de la progenie. Dentro de los estudios de compatibilidad pre-cigótica, aquellos que analicen la relación entre la compatibilidad entre orígenes y el uso diferencial del esperma son los menos explorados. En el próximo capítulo se investiga el efecto de distintos componentes de la primera cópula con relación al comportamiento de recópula.

5. Comportamiento de recópula

5.1 Introducción

La ocurrencia de más de una cópula, cópulas múltiples o recópula, a lo largo de la vida de un insecto puede determinar tanto para el macho como para la hembra un cambio en el éxito reproductivo. Sin embargo, no siempre es claro si ese cambio implica un aumento. La ocurrencia de más de una cópula podría, incluso, ser interpretado como una evidencia indirecta de falta de compatibilidad gamética. Para poder entender las implicancias de los apareamientos múltiples en el éxito reproductivo es necesario analizar las posibles ventajas y desventajas que este comportamiento trae.

Las hembras de los insectos poseen uno o más sacos llamados espermatecas donde almacenan el esperma transferido luego de cada cópula. El esperma almacenado es protegido y nutrido dentro de la espermateca y es utilizado para inseminar los huevos durante la oviposición. Usualmente el esperma transferido en una sola cópula es suficiente para inseminar todos los huevos que depositará una hembra a lo largo de su vida (Christenson y Foote 1960, Thornhill y Alcock 1983). La ocurrencia de más apareamientos parece, entonces, no presentar ningún tipo de significado adaptativo para la hembra. A menos que la hembra tenga algo por ganar en posteriores cópulas, el tiempo invertido en aparearse puede, por sí mismo, actuar como una fuerza evolutiva para reducir la receptividad de la hembra hacia cópulas subsiguientes (Parker, 1970). Asimismo, existe una reducción de la supervivencia asociada al apareamiento, generando un costo por aparearse (discutido en Chapman *et al.* 1998). Durante la cópula aumenta el riesgo de contagio de patógenos o parásitos (Lockhart *et al.* 1996), así como el riesgo de depredación ya que los individuos se encuentran más expuestos (Rowe 1994, Hendrichs *et al.* 1994, Hendrichs y Hendrichs 1998). Las demandas energéticas implicadas en la reproducción son altas (Partridge *et al.* 1987) y se encontraron casos de reducción de la viabilidad asociada al apareamiento *per se* (Fowler y Partridge 1989, Chapman *et al.* 1995). Exponerse a estos riesgos y costos es indispensable en una primera cópula pero no en copulas subsiguientes.

Aún a pesar de los costos asociados al apareamiento, muchos insectos, tanto hembras como machos, se aparean más de una vez a lo largo de su vida (Thornhill y Alcock 1983, Crozier y Page 1985, Ridley 1988). Incluso, se han informado ejemplos de beneficios asociados con los apareamientos múltiples. En las hembras, la ocurrencia de más de una cópula puede aumentar la variabilidad genética de la progenie, la probabilidad de adquirir ‘buenos genes’ (revisado por Yasui 1997, 1998) y, en algunos casos, incrementar la fertilidad y la fecundidad (Ridley 1988, Whittier y Shelly 1993). Asimismo, se postuló que la poliandria podría ocurrir para evitar la incompatibilidad entre genotipos (Zeh y Zeh 1996, 2001, Tregenza y Wedell 1998).

La frecuencia con que se producen las recópulas en muchos grupos de insectos, así como las razones subyacentes, son aún motivo de gran discusión (Sgro *et al.* 1998). El concepto de que la frecuencia de recópula está bajo presión de selección para maximizar la fertilidad de todos los huevos, ha sido utilizado para determinar el número óptimo de cópulas que debe alcanzar una hembra a lo largo de su vida (Pyle y Gromko 1978, Ridley 1989). Esta hipótesis sugiere que, como consecuencia del conflicto que crea la presencia de un costo y un beneficio asociados a la recópula, se llegará a una situación de compromiso que dependerá seguramente de la especie y de ciertos aspectos de la hembra. Con respecto a los machos, la situación es diferente. Los apareamientos múltiples a lo largo de la vida del macho son ventajosos si ellos implican un mayor número de hembras inseminadas y por ello de descendientes (Parker 1970, 1998). Para los machos, los apareamientos múltiples parecen claramente adaptativos (Yasui 1997), por lo que un macho cortejará e intentará aparearse cada vez que encuentre una hembra. Tanto machos como hembras condicionarán su comportamiento de forma de maximizar su éxito reproductivo. Sin embargo, la frecuencia de cópula con que cada sexo lograría este objetivo parece no ser la misma. Esta desigualdad lleva en una selección conflictiva (Snook 2001) hacia una frecuencia óptima (Sgro *et al.* 1998). Asimismo, se ha informado en varios casos que el esperma del segundo macho desplaza o inactiva, total o parcialmente, el esperma del primer macho (Simmons y Siva-Jothy 1998). En cierto sentido esto pone en la hembra la posibilidad de rechazar como padre de su progenie a un macho que durante o luego de la cópula resultó no tan atractivo como se esperaba por el cortejo que desplegó (Eberhard 1996). Este tipo de ‘escape’ puede señalar cierto

grado de incompatibilidad entre dos individuos e incluso extenderse a poblaciones (Markow 1997).

Dentro del marco de la Técnica del Insecto Estéril (TIE), la presencia de recópulas así como la frecuencia de este fenómeno se vuelve un factor importante que puede condicionar el uso de esta medida de control y limitar su éxito. Una hembra que presenta una elevada frecuencia de recópula tiene mayores probabilidades de encontrarse y aparearse con un macho fértil (Bloem *et al.* 1993ab) que una hembra que se aparee solo una vez a lo largo de su vida. Además, los cambios que producen las condiciones de cría artificial sobre los machos se podrían extender a atributos relacionados con el comportamiento post-copulatorio y la propensión a la recópula. Por otro lado, otro autor postuló que la monogamia, o mejor dicho la ocurrencia de una sola cópula a lo largo de toda la vida reproductiva de una hembra, no es un requisito para el funcionamiento de la TIE (Curtis 1985). Por el contrario, tiene la consecuencia adversa de que esas hembras no reaparearán al llegar a una nueva área, permitiendo que las hembras que invaden, desde zonas vecinas sin control hacia áreas bajo TIE, dejen descendencia si llegan inseminadas. Además, si las bases por las cuales las hembras en una zona de liberación discriminan un macho silvestre y fértil de uno estéril de laboratorio son genéticas, hay más riesgo de que se presenten casos de resistencia como los informados por McInnis *et al.* (1996). Si bien no existe acuerdo entre investigadores del verdadero impacto negativo sobre la TIE, es muy importante conocer cuáles son los mecanismos que operan en la disminución de la receptividad de la hembra y cuáles los que llevan a la ocurrencia de recópulas. La posibilidad de manipularlos, a nivel genético, molecular o fisiológico, abre un campo de posibilidades para aumentar el éxito de esta medida de control.

En *Ceratitis capitata* se han realizado diversos estudios con relación a la receptividad, la ocurrencia y frecuencia de apareamientos múltiples y la competencia espermática. La receptividad de las hembras disminuye luego de una primera cópula como consecuencia de la transferencia de esperma y de las secreciones de las glándulas accesorias del macho (Delrio y Cavalloro, 1979, Miyatake *et al.* 1999). Las proteínas de las glándulas accesorias (PGA) modifican el patrón de comportamiento de búsqueda de la hembra. Se

observó que tanto hembras apareadas como hembras a las que se les inyectaron extractos de las glándulas accesorias dejan de buscar *leks* (machos para aparearse) y comienzan a buscar frutas (sitios de oviposición) (Jang 1995, Jang *et al.* 1998, Jang *et al.* 1999). Sin embargo, todos estos procesos no siempre son suficientes para impedir una segunda cópula.

La ocurrencia de apareamientos múltiples fue reportada en varias ocasiones en experimentos realizados con hembras de líneas de cría bajo condiciones de laboratorio (Cavalloro & Delrio 1970, Katiyar y Ramirez 1970, Nakagawa *et al.* 1971, Farias *et al.* 1972, Saul *et al.* 1988, Bloem *et al.* 1993ab, Blay y Yuval 1997), y confirmada para hembras silvestres en el campo (McInnis 1993, Yuval *et al.* 1996) y en estudios de jaulas de campo (Hendrichs *et al.* 1996, McInnis *et al.* en prensa). Bajo condiciones de laboratorio, se observó que la propensión a la recópula aumenta si el nivel de esperma en la espermateca disminuye (Nakagawa *et al.* 1971), si el estado nutritivo del primer macho es pobre en proteínas (Blay y Yuval 1997), si la cópula es de corta duración (Farias *et al.* 1972, Saul *et al.* 1988) o si el macho transfiere esperma estéril (Cavalloro & Delrio 1970, Katiyar y Ramirez 1970, Bloem *et al.* 1993b). En el campo, en áreas bajo control con TIE, McInnis (1993) encontró, hembras con esperma irradiado y no irradiado dentro de la espermateca. Lamentablemente, no es posible determinar la secuencia de los apareamientos ya que en las espermatecas de *C. capitata* el esperma de diversos machos se mezcla sin importar el orden en que se producen los apareamientos (Saul *et al.* 1988). Por otro lado, Yuval *et al.* (1996), basados en la cantidad de esperma encontrado en hembras silvestres y comparando con los valores encontrados en hembras de laboratorio, postularon que la mejor explicación para la cantidad observada era la ocurrencia de recópulas frecuentes en la naturaleza. Estudios realizados en laboratorio mostraron que el segundo macho fecunda mayor cantidad de huevos que el primero (Saul *et al.* 1988, Saul y McCombs 1993a).

Si bien estos trabajos identificaron factores que modulan el comportamiento de recópula en la hembra, la mayoría de ellos fueron realizados bajo condiciones de laboratorio, generalmente con una sola línea o cepa y las hembras se encontraban aisladas. Un análisis más próximo a lo que realmente ocurre en la naturaleza debería incluir

poblaciones silvestres e individuos de varios orígenes, condiciones naturales o semi-naturales, un diseño experimental que permita estudiar el comportamiento de varias hembras en un mismo entorno, y un seguimiento a lo largo de toda la vida de las hembras. Dichos estudios requieren la identificación individual de los insectos y tiempos de observación prolongados. Este último requisito es fácil de lograr en condiciones de laboratorio, donde las variables ambientales están controladas. Sin embargo, en condiciones de campo, se torna más difícil programar estudios de varios días de observación sin aumentar la probabilidad de tener días con condiciones ambientales adversas para la realización del experimento.

Con el objeto de analizar el comportamiento de recópula tanto de machos como de hembras de *Ceratitis capitata* se realizaron dos estudios. Uno bajo condiciones de laboratorio, utilizando líneas con distinta antigüedad bajo cría en el laboratorio, con un período de observación de cuatro días seguidos, y otro bajo condiciones semi-naturales, en jaulas de campo, con material silvestre y de cría y por un período de observación de 10 horas. Como los procedimientos fueron distintos, los materiales y métodos, y la presentación de los resultados, se detallan por separado. Sin embargo, la interpretación de los resultados así como la discusión se realiza en forma conjunta.

5.2 Análisis del comportamiento de recópula bajo condiciones de laboratorio

El comportamiento de recópula en adultos de *Ceratitis capitata* bajo condiciones de laboratorio, fue analizado durante una visita a la Unidad de Entomología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Manchester, Reino Unido. El estudio se realizó bajo la supervisión de los Dres. Roger Wood y André Gilburn, durante los meses de septiembre a noviembre de 1998 y fue financiado con una beca de la Fundación Antorchas y el Consejo Británico.

Material y métodos

Material biológico.

Las líneas utilizadas fueron Pet-84, Gua-98 y la población silvestre Ant. Asimismo se estableció una línea híbrida, AnPet, luego de cruzar machos Ant con hembras Pet-84 (Capítulo 3.4, Tablas 3.1 y 3.2). Esta línea fue analizada solo en la primera generación. Se siguieron los procedimientos de cría descritos en Hunt (2000).

Sexado y marcado.

Las pupas de todas las líneas fueron colocadas bajo las mismas condiciones hasta obtener la emergencia de adultos. A medida que esta se producía se inmovilizaba a las moscas y se las sexaba. Un día antes de cada experimento se marcaron individualmente las moscas colocándoles una letra en el tórax (ver Material y Métodos). Para cada línea se utilizó un color de papel distinto.

Pruebas de recópula.

Las observaciones del comportamiento reproductivo se realizaron en cajas de acrílico de 30 x 20 x 20 cm. Cada prueba consistió en la liberación de 25 machos y 25 hembras de dos de las líneas a analizar (100 moscas en total). A las 20 hs. del día anterior al inicio de las pruebas se procedía a la liberación de los machos en la caja. A la mañana siguiente (8:30 AM), media hora después de que se prendieran las luces del cuarto de pruebas, se liberaban las hembras. A medida que se producían las cópulas, las parejas eran retiradas de la caja y se las dejaba completar la misma, registrándose para ambos sexos la letra y población de origen, y para la cópula, la hora de inicio y finalización. Una vez finalizada la cópula, ambas moscas eran devueltas a la caja. Luego de ocho horas de observación, se retiraban las hembras de la caja. Al día siguiente se procedía de la misma forma y se registraban las cópulas. Cada experimento duró cuatro días y los días 2-4 constaron de seis horas de observación. En forma simultánea se realizaron pruebas de recópula en cajas del mismo tamaño pero con un número menor de moscas (5 moscas de cada sexo y línea, resultando 20 moscas en total), de manera de disminuir la densidad de moscas en la caja.

Bajo condiciones de alta densidad se realizaron tres pruebas que difirieron en las líneas utilizadas. Una entre las líneas Ant y Pet-84 (una réplica), otra entre Gua-98 y Pet-84 (siete réplicas) y la última entre machos AnPet, hembras Gua-98 y machos y hembras Pet-84 (una réplica). Con respecto a este último tratamiento sólo se incluyeron en el análisis las cruza que involucraron hembras Pet-84, ya que solo las hembras de esta línea estuvieron confrontadas a machos de otra línea junto a machos de su misma línea. En condiciones de baja densidad se realizaron dos tipos de pruebas. Una entre Gua-98 y Pet-84 (quince repeticiones) y la otra entre AnPet y Pet-84 (cinco repeticiones).

Análisis de datos.

La posibilidad de identificar a las moscas individualmente y de observar su comportamiento durante cuatro días seguidos permitió obtener información muy detallada para cada individuo como, por ejemplo, el número de cópulas alcanzado, la duración de las mismas, el tiempo transcurrido entre ellas. Esta información permitió analizar distintos aspectos del comportamiento reproductivo de las líneas utilizadas.

Para determinar si las condiciones del experimento fueron apropiadas para el estudio propuesto se determinó el porcentaje de cópulas alcanzado en cada caja. Se analizó el grado de compatibilidad para el apareamiento entre las líneas considerando la primera cópula de cada hembra a través del cálculo de los índices RII e ISI (ver Compatibilidad para el Apareamiento). En los casos donde hubo valores iguales a cero para cópulas homotípicas se calculó el RII corregido (McInnis *et al.* 1996). La significación estadística de los índices se determinó con un test de χ^2 de Bondad de Ajuste sumando, para cada tratamiento, los datos de todas las réplicas. La influencia del origen del macho o de la hembra en la duración de la primera cópula fue analizada a través de un ANOVA de dos factores y del test Tukey HSD de comparaciones múltiples en caso de que el ANOVA resultara significativo.

El efecto de la densidad de moscas en la caja sobre la tasa de recópula se determinó analizando el número de hembras que se aparearon una vez o más de una vez en las cajas que involucraron las líneas Gua-98 y Pet-84 para las dos densidades mediante un χ^2 de Homogeneidad. Asimismo se determinó el posible efecto del origen de la hembra

en la propensión a la recópula con este mismo test para cada una de las densidades analizadas. El nivel de actividad de los machos fue analizado de la misma forma.

Para establecer la posible influencia de los distintos aspectos de la primera cópula en la probabilidad de que la hembra recopule, se realizó un análisis de regresión logística múltiple (Agresti 1996). Esta aproximación ha sido sugerida para el estudio de selección con variables dicotómicas (Janzen y Stern 1998). A aquellas hembras que a lo largo del experimento se aparearon una sola vez se les asignó un valor de cero, mientras que, a las que se aparearon más de una vez, se les asignó un valor de uno. Esta nueva variable, *recópula*, fue utilizada como la variable dependiente en la regresión logística. El origen y el estado copulatorio (virgen o no-virgen) del macho, la duración de la cópula y el número total de cópulas alcanzadas por el macho a lo largo de todo el experimento (como una medida de su éxito en el apareamiento) fueron utilizadas como las variables independientes dentro de la regresión y se las fue quitando del modelo (procedimiento *backward*) hasta que la regresión fuese significativa. Este análisis se realizó para cada tipo de hembra (Gua-98 o Pet-84) y para cada densidad (baja o alta) por separado. En el caso de las hembras Pet-84 para cada densidad se sumaron los datos de todas las cajas. Para las hembras Gua-98 se usaron solo los datos de las cajas pertenecientes a la prueba Gua-98 x Pet-84. Cuando alguna de las variables independientes resultó significativa en el modelo de regresión se realizaron análisis posteriores para interpretar el sentido biológico de dicha asociación.

El período refractario fue determinado como el tiempo transcurrido entre la primera y la segunda cópula para cada hembra. Se evaluó, en forma exploratoria, la posible correlación entre esta variable y el origen y número total de cópulas alcanzadas por la hembra a lo largo del experimento junto a las variables ya utilizadas en la regresión logística mediante una correlación de rangos de Spearman. Para aquellas variables que resultaron correlacionadas se realizó un ANOVA de un factor y posteriormente comparaciones múltiples de a pares.

Se analizó el grado de preferencia por parte de la hembra en la elección del segundo macho luego de la primera cópula en las cajas Gua-98 x Pet-84. Se consideró en este

caso para el cálculo de los índices de compatibilidad sólo la segunda cópula de cada hembra y se sumaron todas las cajas para cada densidad. Estos valores fueron contrastados con los obtenidos anteriormente cuando se determinó la compatibilidad en la primera cópula mediante un test de χ^2 de Homogeneidad. El posible efecto del estado copulatorio, tanto del macho como de la hembra en la duración de la cópula fue determinado con una ANOVA multifactorial incluyendo también el origen del macho y de la hembra. Posibles diferencias entre la duración de la primera cópula y la segunda en una misma hembra fueron determinadas con un test de t para muestras pareadas.

Resultados

Compatibilidad entre líneas y primera cópula.

El porcentaje de cópulas alcanzado en las cajas con alta densidad de moscas fue, en todos los casos, superior al 75%, indicando un buen nivel de receptividad en las hembras (Tabla 5.1). El grado de compatibilidad entre líneas medida a través de los índices RII e ISI también fue alto. En todas las pruebas estos índices no difirieron de lo esperado para cópulas al azar (valores de χ^2 con $P > 0.05$). De esta forma, bajo el protocolo propuesto, fue posible obtener todas las combinaciones de cópulas esperadas dentro de cada caja y así analizar el comportamiento de recópula.

Prueba	δ	#	% cópula	Compatibilidad	
				RII	ISI
Ant - Pet-84	a	1	75	0.58	0.05
Gua-98 - Pet-84	a	7	92.6 ± 5.8	1.55 ± 1.25	0.04 ± 0.20
Gua-98 - Pet-84	b	15	87.8 ± 11.6	2.47 ± 2.17	0.07 ± 0.32
AnPet - Pet-84	b	5	81.6 ± 13.7	1.87 ± 2.43	-0.02 ± 0.43

Tabla 5.1: Porcentaje de cópula e índices de compatibilidad para cada prueba. Media ± desvío estándar. δ : densidad de moscas en la caja, a - alta, b - baja; #: repeticiones por prueba; RII: Índice de Aislamiento Relativo; ISI: Índice de Aislamiento Sexual.

Cuando se analizó el efecto del origen de cada sexo sobre la duración de las cópulas que involucraron individuos vírgenes (Tabla 5.2), el origen del macho presentó una fuerte asociación con esta variable ($F = 53.31$, $gl = 334$, $P < 0.0001$). Aquellas cópulas que involucraron machos Gua-98 duraron más que las que involucraron machos Pet-84, y estas diferencias fueron estadísticamente significativas según el test Tukey HSD de

comparaciones múltiples ($P < 0.0001$ en todas las comparaciones que involucraron machos Gua-98 vs. Pet-84). Las cópulas con machos AntPet y hembras Pet-84 fueron más largas que las que involucraron hembras Pet-84 y machos Pet-84 o Gua-98. Sin embargo, no fueron incluidas en el análisis por estar representadas por menos casos que las otras dos. El origen de la hembra no mostró ninguna asociación con la variable analizada ($F = 1.22$, $gl = 334$, $P = 0.269$) y la interacción entre ambos factores fue no significativa ($F = 0.14$, $gl = 334$, $P = 0.709$).

Origen del macho	Origen de la Hembra			
	Ant	AnPet	Gua-98	Pet-84
AnPet	-	2:31 ± 0:41 (4)	-	3:00 ± 0:39 (15)
Gua-98	-	-	2:34 ± 0:34 (98) a	2:37 ± 0:33 (61) a
Pet-84	1:46 ± 0:30 (3)	2:21 ± 0:53 (6)	2:02 ± 0:35 (99) b	2:08 ± 0:44 (80) b

Tabla 5.2: Duración de la primera cópula (hh:mm) teniendo en cuenta el origen del macho y de la hembra en cada tipo de cruce. Media ± desvío estándar (N). Los valores seguidos de una misma letra no difieren según el test de Tukey.

Tasa de recópula para machos y hembras

Tanto en hembras como machos se registraron casos de más de una cópula a lo largo del periodo de observación, aunque esto no sucedió en todas las líneas (Tabla 5.3). Los machos Ant y las hembras AnPet no recopularon. El número más alto de cópulas registrado fue siete para un macho, y nueve para una hembra.

Prueba	δ	Origen	Machos	Hembras
Ant x Pet-84	a	Ant	1.00 ± 0.00 (4)	1.33 ± 0.89 (12)
		Pet-84	3.25 ± 1.69 (16)	1.74 ± 1.63 (19)
Gua-98 x Pet-84	a	Gua-98	2.51 ± 1.48 (123)	2.51 ± 1.65 (136)
		Pet-84	2.73 ± 1.48 (136)	2.22 ± 1.70 (129)
Gua-98 x Pet-84	b	Gua-98	2.07 ± 1.29 (45)	1.91 ± 1.18 (68)
		Pet-84	2.35 ± 1.09 (51)	1.43 ± 0.87 (53)
AnPet x Pet-84	b	AnPet	2.00 ± 1.00 (13)	1.00 ± 0.00 (17)
		Pet-84	1.58 ± 0.90 (12)	1.37 ± 0.83 (19)

Tabla 5.3: Número de cópulas para machos y hembras a lo largo de los cuatro días de observación dentro de cada prueba. Media ± DS (N). δ : densidad de moscas en la caja, a - alta, b - baja.

Tanto para Pet-84 como para Gua-98 la tasa de recópula fue mayor en las cajas con alta densidad de moscas que en las cajas con baja densidad (Tabla 5.4) independientemente del sexo. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para hembras Pet-84

($\chi^2_{(1)} = 6.49$, $P = 0.012$) y para hembras Gua-98 ($\chi^2_{(1)} = 4.87$, $P = 0.027$). En los machos las diferencias también fueron significativas ($\chi^2_{(1)} = 5.21$, $P = 0.022$ para Pet-84, y $\chi^2_{(1)} = 5.61$, $P = 0.018$ para Gua-98). Asimismo, el origen de la hembra mostró un efecto en la tasa de recópula. Las hembras Gua-98 se aparearon más veces que las hembras Pet-84 tanto en condiciones de alta ($\chi^2_{(1)} = 5.89$, $P = 0.015$), como baja ($\chi^2_{(1)} = 4.51$, $P = 0.034$) densidad de moscas. Por su parte, no se observó una relación entre la tasa de recópula de los machos y el origen de los mismos en ninguna de las dos densidades analizadas ($\chi^2_{(1)} = 2.38$, $P = 0.123$ y $\chi^2_{(1)} = 1.37$, $P = 0.241$, para alta y baja densidad de moscas en caja respectivamente).

N° cópulas	Hembras Pet-84		Hembras Gua-98		Machos Pet-84		Machos Gua-98	
	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja	Alta	Baja
1	66	37	51	35	52	34	63	38
> 1	68	16	95	34	89	29	74	21
Total	134	53	146	69	141	63	137	59

Tabla 5.4: Número de individuos que se aparearon una vez (1) o más de una vez (> 1) en función de la densidad de moscas en la caja (alta, 100 moscas por caja; baja, 20 moscas por caja), del sexo y del origen de las líneas. Se consideraron solo las pruebas que involucraron las líneas Gua-98 y Pet-84.

Variables de la primera cópula y propensión a la recópula

La importancia de la densidad de moscas en la caja, así como del origen de la hembra en la tasa de recópula, llevó a la realización de cuatro análisis de regresión logística múltiple separados. Uno para cada tipo de hembra (Gua-98 o Pet-84) en cada una de las dos densidades experimentadas (baja o alta). Para los cuatro casos el modelo resultó significativo con una sola variable independiente (Tabla 5.5). La importancia de cada una de ellas fue analizada con mayor detalle.

Regresión	χ^2	gl	P	Variables involucradas
Pet-84 – Baja	9.73	1	0.002	Duración
Pet-84 – Alta	4.31	1	0.038	Origen macho
Gua-98 – Baja	5.09	1	0.023	Estado copulatorio
Gua-98 – Alta	4.02	1	0.045	Estado copulatorio

Tabla 5.5: Valores de χ^2 del modelo de regresión logística para hembras Pet-84 y Gua-98 bajo las dos densidades de moscas en caja.

Duración de la primera cópula

En condiciones de baja densidad, las hembras Pet-84 cuya primera cópula había sido larga, tuvieron una menor propensión a la recópula que aquellas hembras con una primera cópula corta (Tabla 5.6). Un test de t mostró que la duración de la primera cópula de las hembras apareadas con machos Pet-84 y que luego recopularon fue significativamente menor a la de aquellas hembras que no reaparearon ($t = 2.89$, $gl = 33$, $P = 0.007$). Para aquellas cópulas que involucraron machos Gua-98 no se observó esta tendencia ($t = -0.07$, $gl = 20$, $P = 0.947$). Bajo condiciones de alta densidad, la duración no tuvo un efecto significativo sobre la propensión a la recópula. Si bien las hembras apareadas con machos Pet-84, y que luego reaparearon, mostraron una tendencia hacia un valor medio menor que las hembras que no reaparearon, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($P = 0.093$).

Origen Macho	Baja densidad		Alta densidad	
	No reapareantes	Reapareantes	No reapareantes	Reapareantes
AnPet	2:50 ± 0:41 (11)	2:30 ± - (1)	3:11 ± 0:42 (7)	3:03 ± 0:07 (3)
Gua-98	2:22 ± 0:29 (17)	2:24 ± 0:35 (5)	2:28 ± 0:29 (39)	2:30 ± 0:50 (28)
Pet-84	2:15 ± 0:29 (21)	1:39 ± 0:45 (14)	2:15 ± 0:41 (43)	1:59 ± 0:49 (53)
Todos	2:26 ± 0:34 (49)	1:53 ± 0:46 (20)	2:25 ± 0:39 (85)	2:12 ± 0:51 (84)

Tabla 5.6: Duración de la primera cópula para hembras Pet-84 bajo las dos densidades en función del origen del macho y de si reaparearon o no. Media ± desvío estándar (N). No se informan los valores de las cópulas con machos Ant ya que ninguna de las hembras apareadas con dichos machos recopuló.

En las hembras Gua-98 la propensión a la recópula no se vio asociada a la duración de la primera cópula. De todos modos, se analizó el valor medio de la duración para cada tipo de macho, bajo las dos densidades considerando si las hembras reaparearon o no. Se observó una diferencia entre medias en condiciones de baja densidad y para hembras apareadas con machos Gua-98 ($t = -3.08$, $gl = 33$, $P = 0.004$). Al contrario de lo que sucedió en las hembras Pet-84, en este caso las hembras reapareantes presentaron valores de duración de cópula mayores a las hembras no reapareantes (Tabla 5.7). Si bien, para las cópulas que involucraron machos Pet-84 se observó que la duración de las hembras reapareantes era menor que las no reapareantes, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($t = 1.75$, $gl = 31$, $P = 0.090$). En condiciones de alta densidad, no se observó un efecto de la duración en la propensión a la recópula. Para la cruce Gua-98 x Gua-98 en las hembras no reapareantes, las cópulas en condiciones de

baja densidad fueron más cortas que las cópulas en condiciones de alta densidad (Tabla 5.7, $t = 2.12$, $gl = 45$, $P = 0.039$).

Origen Macho	Baja densidad		Alta densidad	
	No reapareantes	Reapareantes	No reapareantes	Reapareantes
Gua-98	2:11 ± 0:39 (20)	2:45 ± 0:23 (16)	2:34 ± 0:33 (27)	2:31 ± 0:42 (47)
Pet-84	2:13 ± 0:27 (15)	1:51 ± 0:39 (18)	1:54 ± 0:48 (24)	1:57 ± 0:34 (47)
Todos	2:12 ± 0:34 (35)	2:17 ± 0:42 (34)	2:15 ± 0:45 (51)	2:14 ± 0:42 (94)

Tabla 5.7: Duración de la primera cópula para hembras Gua-98 bajo las dos densidades en función del origen del macho y de si eran reapareantes o no. Media ± desvío estándar (N).

Origen del macho en la primera cópula

Las hembras Pet-84 en altas densidades, respondieron en forma diferencial en función del origen del primer macho (Tabla 5.5). Se observó una tendencia hacia una mayor propensión a la recópula en hembras apareadas por primera vez con machos Pet-84 respecto a hembras apareadas con machos AntPet. Las hembras apareadas con machos Gua-98 mostraron valores intermedios y las hembras apareadas con machos Ant no reaparearon (Figura 5.1). De las líneas analizadas, Pet-84 presentó más de 200 generaciones bajo cría de laboratorio, Gua-98 aproximadamente siete y AntPet solo una.

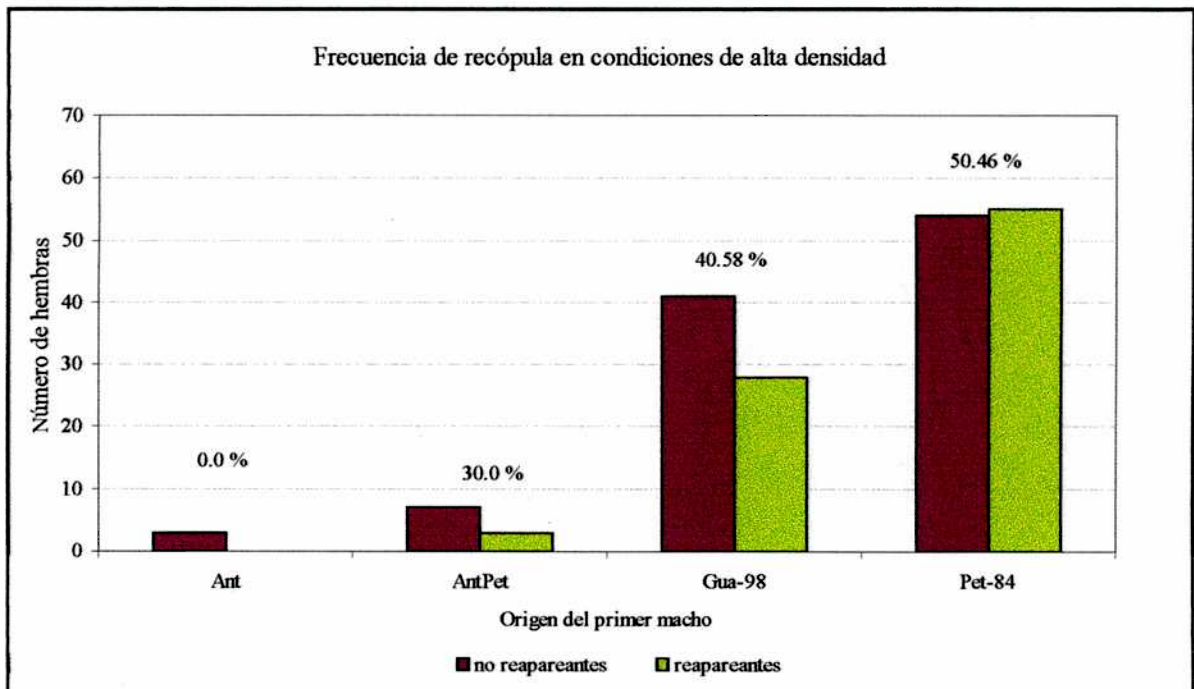


Figura 5.1: Número de hembras que reaparearon, en condiciones de alta densidad, en función del origen del macho con el que se aparearon la primera vez.

Si bien el efecto del origen del macho en la propensión a la recópula no fue estadísticamente significativo en las cajas con baja densidad, la tendencia fue la misma (Figura 5.2).

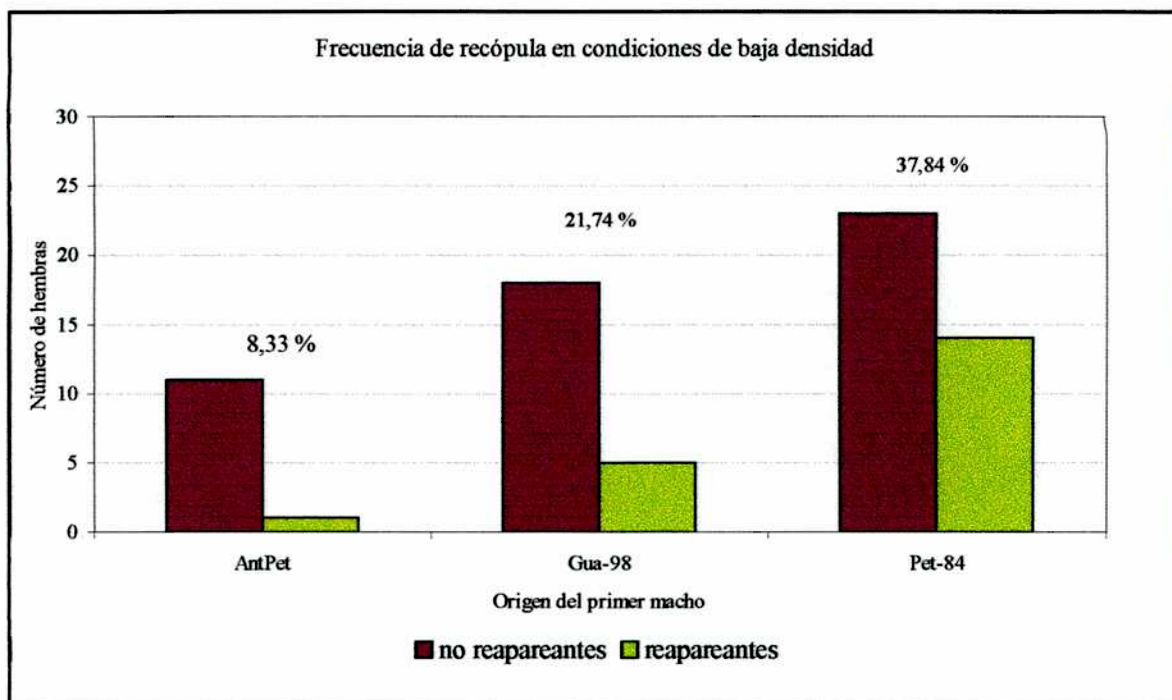


Figura 5.2: Número de hembras que reaparearon, en condiciones de baja densidad, en función del origen del macho con el que se aparearon la primera vez.

Estado copulatorio del primer macho

El estado copulatorio del primer macho (virgen o no virgen), resultó significativo en el caso de las hembras Gua-98 para ambas densidades (Tabla 5.5). Aquellas hembras apareadas con machos no vírgenes mostraron una menor propensión a la recópula (25.0% y 45.0% en cajas con baja y alta densidad de moscas respectivamente) que las hembras apareadas con machos vírgenes (56.6% y 68.5% en cajas con baja y alta densidad de moscas respectivamente). Para las hembras Pet-84 esta variable no resultó significativa.

Éxito copulatorio del macho

El número de cópulas alcanzadas por cada macho a lo largo de la prueba puede ser considerado como una medida del éxito copulatorio del mismo. Esta variable no se asoció en forma significativa con la probabilidad de reapareamiento, sugiriendo que el

éxito en el apareamiento del macho no siempre está correlacionado con el éxito post-copulatorio, si asumimos que la disminución en la receptividad de la hembra es una medida indirecta de este último.

Período refractario

El período refractario, entre la primera y la segunda cópula, de las hembras se correlacionó con la densidad de moscas en la caja ($r = -0.21$, $P = 0.002$) y con el número total de apareamientos alcanzados por las hembras ($r = -0.39$, $P < 0.0001$). Las hembras en las cajas con alta densidad de moscas mostraron un período refractario más corto que las hembras en cajas con baja densidad (Tabla 5.8). Asimismo, las hembras que se aparearon muchas veces a lo largo del experimento presentaron los menores valores de período refractario. No se encontraron diferencias en los períodos refractarios debidas al origen del macho ($r = 0.09$, $P = 0.217$), de la hembra ($r = 0.12$, $P = 0.091$), o a la duración de la primera cópula. ($r = 0.07$, $P = 0.316$).

Macho	Alta		Baja	
	Hembra Gua-98	Hembra Pet-84	Hembra Gua-98	Hembra Pet-84
Gua-98	12:25 ± 16:10 (48)	16:46 ± 19:29 (27)	25:26 ± 22:08 (16)	18:33 ± 19:19 (5)
Pet-84	18:01 ± 20:31 (52)	13:26 ± 16:56 (53)	26:48 ± 24:32 (18)	30:07 ± 23:08 (14)

Tabla 5.8: Período refractario (hh:mm) para cada origen de hembra teniendo en cuenta la densidad y el origen del primer macho. Media ± desvío estándar (N).

Con respecto al período refractario del macho, también se observó una correlación con la densidad de moscas en la caja ($r = -0.15$, $P = 0.023$) y con el número total de apareamientos alcanzados ($r = -0.43$, $P < 0.0001$). Los machos en las cajas con alta densidad de moscas mostraron un período refractario más corto que los de las cajas con baja densidad (Tabla 5.9). Asimismo, los machos que se aparearon muchas veces a lo largo del experimento presentaron los menores valores de período refractario. No se encontraron diferencias en los períodos refractarios debidas al origen del macho ($r = -0.06$, $P = 0.384$), o a la duración de la primera cópula. ($r = -0.02$, $P = 0.809$). Las tendencias observadas para el período refractario entre la primera y segunda cópula se mantuvieron cuando se analizaron, para cada individuo, todos los valores registrados (datos no mostrados).

Hembra	Alta		Baja	
	Macho Gua-98	Macho Pet-84	Macho Gua-98	Macho Pet-84
Gua-98	15:56 ± 16:53 (48)	13:12 ± 17:12 (58)	18:22 ± 17:27 (18)	20:04 ± 19:06 (22)
Pet-84	14:17 ± 17:18 (36)	14:24 ± 15:02 (43)	14:08 ± 24:13 (4)	27:47 ± 17:00 (16)

Tabla 5.9: Período refractario (hh:mm) para cada origen de macho teniendo en cuenta la densidad y el origen de la hembra con la que se aparearon por primera vez. Media ± desvío estándar (N).

Se observó que el desvío estándar de los períodos refractarios obtenidos era grande (Tablas 5.8 y 5.9). Esto pudo estar generado por la forma en que se calculó esta variable: hora de inicio de la segunda cópula - hora de finalización de la primera, incluyendo, en los casos que la segunda cópula sucedió al día siguiente, al período sin observación (16 hs.). Para remover este posible artificio, se analizaron los períodos refractarios de las hembras que reaparearon el mismo día. Para garantizar un buen número de datos, se utilizaron sólo las cajas con alta densidad de moscas. El análisis se realizó de la misma forma que antes. Se observó un efecto del origen de la hembra ($r = 0.27$, $P = 0.003$), pero no del macho ($r = -0.08$, $P = 0.405$). Las hembras Pet-84 mostraron los valores medios más bajos (Tabla 5.10). El mismo análisis realizado para el período refractario de los machos no mostró asociaciones significativas entre las variables analizadas.

Macho	Hembra	
	Gua-98	Pet-84
Gua-98	1:57 ± 1:28 (30) ab	1:14 ± 1:03 (14) a
Pet-84	2:43 ± 1:40 (25) b	1:34 ± 1:12 (26) a

Tabla 5.10: Período refractario (hh:mm) entre la primera y segunda cópula para cada tipo de cruce en aquellas hembras que reaparearon el mismo día. Media ± desvío estándar (N). Los valores seguidos de una misma letra no difieren según el test de Tukey.

Por otro lado, se analizó el período refractario como una variable discreta (número de días hasta la próxima cópula en vez de horas). Esto permitió incluir todos los datos (independientemente de si la segunda cópula se produjo en el mismo día o no que la primera) y minimizó el desvío. Los resultados mostraron las mismas tendencias que en el análisis original. Tanto hembras como machos, de ambos orígenes, mostraron una fuerte asociación entre el período refractario y el número de cópulas alcanzadas y entre este y la densidad de moscas en las cajas (correlación de Spearman, $P < 0.01$).

Segunda cópula

El número de parejas obtenidas para cada tipo de combinación de macho y hembra fue distinto para hembras reapareantes que para hembras vírgenes. (Tabla 5.11). En las cajas con alta densidad, las cópulas no se distribuyeron homogéneamente sugiriendo apareamiento clasificado positivo, con exceso de cruza homotípicas (RII = 2.94; ISI = 0.20, $\chi^2_{(1)} = 6.68$, P = 0.010). Las hembras Pet-84 se aparearon en mayor proporción con machos de su mismo origen ($\chi^2_{(1)} = 9.25$, P = 0.002), mientras que las hembras Gua-98 se aparearon en igual proporción con ambos tipos de machos (P > 0.05). Asimismo, las proporciones de cada tipo de cruce en la primera cópula fueron distintas si el conjunto de hembras era reapareante o no reapareante ($\chi^2_{(3)} = 9.12$, P = 0.028). En aquellas hembras que reaparearon, la cruce Gua-98 x Pet-84 fue la menos representada, mientras que, en las hembras que no reaparearon la proporción de parejas para cada tipo de cruce fue homogénea. En las cajas con baja densidad no se observaron evidencias de apareamiento clasificado para la segunda cópula (RII = 0.61 e ISI = -0.20, $\chi^2_{(1)} = 2.00$, P = 0.157).

Tipo de cruza	Alta densidad				Baja densidad			
	G x G	G x P	P x G	P x P	G x G	G x P	P x G	P x P
1 ^{ra} no-reap.	27	36	24	28	20	18	15	19
1 ^{ra} reap.	47	27	48	41	16	5	18	11
2 ^{da} cópula	48	17	48	50	11	7	23	9

Tabla 5.11: Número de cópulas para cada tipo de cruce considerando para la primera cópula si la hembra reapareo o no, y para la segunda cópula todos los casos. G: Gua-98, P: Pet-84.

Duración de la cópula, origen y estado copulatorio de machos y hembras

Con respecto a la duración de la cópula, el ANOVA de cuatro factores, mostró que ciertas variables independientes y las interacciones entre algunas de ellas resultaron significativas (Tabla 5.12). Las mismas fueron: el origen del macho, el estado copulatorio de la hembra, la interacción entre ambas, la interacción entre el estado copulatorio de la hembra y del macho y la interacción entre el origen del macho y el estado copulatorio de ambos sexos. El origen de la hembra mostró no estar asociado con la duración de la cópula.

Factores	F	P
om	8.36	0.004
oh	1.11	0.292
em	1.19	0.277
eh	25.63	< 0.001
om • oh	1.03	0.311
om • em	1.87	0.172
oh • em	1.34	0.248
om • eh	9.92	0.002
oh • eh	0.50	0.480
em • eh	8.54	0.004
om • oh • em	3.56	0.060
om • oh • eh	2.93	0.087
om • em • eh	8.49	0.004
oh • em • eh	0.82	0.365
om • oh • em • eh	1.02	0.312

Tabla 5.12: Valores de F del ANOVA de cuatro factores para duración de la cópula. om: origen del macho, oh: origen de la hembra, em: estado copulatorio del macho y eh: estado copulatorio de la hembra. gl = 1, 777.

Las cópulas que involucraron machos Gua-98 vírgenes y hembras vírgenes duraron más que cualquiera de las otras tres combinaciones posibles (Tabla 5.13). Con respecto a las cópulas de los machos Pet-84, sólo se encontraron diferencias cuando los dos estados copulatorios coincidían, es decir, hembras y machos vírgenes vs. hembras y machos apareados (Tabla 5.13).

Machos	Origen	Estado copulatorio	Estado copulatorio hembras	
			Vírgenes	Apareadas
Gua-98		Vírgenes	2:35 ± 0:34 (152) a	1:33 ± 0:53 (9) b
		Apareados	2:09 ± 0:40 (51) b	1:59 ± 0:40 (140) b
Pet-84		Vírgenes	2:00 ± 0:39 (153) a	1:51 ± 0:39 (30) ab
		Apareados	1:51 ± 0:42 (57) ab	1:41 ± 0:38 (201) b

Tabla 5.13: Duración de la cópula (hh:mm) en función de los tres factores que mostraron tener un efecto en esta variable: origen del macho y estado copulatorio de machos y hembras. Media ± desvío estándar (N). Para cada origen de macho, los valores seguidos de una misma letra no difieren según el test de Tukey.

Para una misma hembra que se apareó por primera y segunda vez con machos del mismo origen, la segunda cópula fue más corta que la primera (test de *t* para muestras pareadas, $t = 3.19$, gl = 114, $P = 0.002$). Sin embargo, esta diferencia no fue homogénea para todas las cruzas. Las cruzas que involucraron machos Pet-84 no mostraron esta tendencia ($P > 0.05$), mientras que las que involucraron machos Gua-98 sí la mostraron

($t = 2.79$, $P = 0.021$ para Gua-98 x Pet-84 y $t = 3.09$, $P = 0.005$ para Gua-98 x Gua-98). Debido al fuerte efecto encontrado anteriormente del estado copulatorio del macho, se realizó el mismo análisis restringiendo a machos vírgenes y se observó la misma tendencia tanto para todos los datos agrupados ($t = 3.95$, $gl = 90$, $P = 0.0001$) como para cada tipo de macho por separado (Tabla 5.14).

Cruza	Duración cópula		N
	1era	2da	
Gua-98 x Gua-98	2:37 ± 0:43 a	1:48 ± 0:38 b	25
Gua-98 x Pet-84	2:37 ± 0:51 a	1:56 ± 0:42 b	9
Pet-84 x Gua-98	1:56 ± 0:34 a	1:43 ± 0:37 a	32
Pet-84 x Pet-84	2:00 ± 0:52 a	1:45 ± 0:43 a	25
Todas	2:12 ± 0:47 a	1:36 ± 0:39 b	91

Tabla 5.14: Duración de la primera y segunda cópula (hh:mm) en hembras apareadas con machos vírgenes del mismo origen. Media ± desvío estándar (N). Para cada tipo de cruce (fila), los valores seguidos de una misma letra no difieren según el test de t de muestras pareadas.

5.3 Análisis del comportamiento de recópula bajo condiciones de jaula de campo

El estudio del comportamiento de recópula en hembras silvestres fue realizado en marzo de 2000 como parte complementaria a un estudio de competitividad de machos de la cepa Cast-191, desarrollada en el IGEAF, INTA Castelar. Estas pruebas se llevaron a cabo en el campo experimental del instituto bajo la dirección del Dr. Cladera, en coincidencia con la visita del Dr. McInnis (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, USDA – Hawaii) y con la participación de investigadores de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (FCEyN), la Comisión Nacional de Energía Atómica, (CNEA), el Instituto de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de Mendoza (ISCAMen) y del INTA. Los resultados del análisis de la competitividad de los machos son discutidos en detalle por Cladera *et al.* (2002). En esta sección sólo se presentan, en forma detallada, los resultados del análisis del comportamiento de recópula.

Material y métodos

Material biológico

La población silvestre utilizada fue SanP, proveniente de la Estación Experimental INTA San Pedro y de fincas frutícolas vecinas. Asimismo, se utilizaron las líneas de sexado genético Cast-191 y Seib 6-96. Las dietas utilizadas tanto para adultos como para larvas de Cast-191 fueron las mismas que las presentadas en el capítulo de Material y Métodos. La línea Seib 6-96 era utilizada para la época de este estudio en los Programas de Erradicación de Mosca de la Fruta (PROCEM) en Mendoza y Patagonia y fue gentilmente enviada en estado de pupa desde el Insectario BioKm8 - ISCAMen, Mendoza. Para ambas líneas se utilizaron solo los machos. En el caso de Cast-191 se los utilizó tanto fértiles (Cast) como estériles (Cast*) y en el caso de Seib 6-96 sólo estériles (Seib*). La irradiación de las pupas Cast-191 se realizó en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) utilizando una dosis media de 118.5 Gy (mínima 117 Gy, máxima 120 Gy) en un irradiador Gammacell 220 de Co60 (Allinghi, com. pers.). La irradiación de las pupas Seib 6-96 se realizó en la planta de producción, BioKm 8, del ISCAMen, bajo hipoxia en un irradiador IMCO 20 Co60, con una dosis de absorción mínima de 100 Gy y máxima de 150 Gy, y se las envió por avión el mismo día de la irradiación a la zona de estudio (aprox. 1.30 hs. de vuelo).

Sexado y marcado

El procedimiento de sexado fue el mismo que el descrito en Material y Métodos. Se colocaron 60 individuos de cada sexo en un recipiente plástico de 1 lt. con agua y comida para adultos y se permitió que alcanzaran la madurez sexual (11-14 días para SanP y 5-6 días para las líneas de laboratorio). En el caso del material irradiado se utilizaron aquellos machos que emergieron entre las 48-72 hs. post-irradiación. Como el objetivo principal de este estudio era determinar posibles efectos del origen del macho y de la esterilización en la propensión a la recópula, los machos no llevaron marca individual, sino poblacional. Las hembras, por su parte, fueron marcadas individualmente con el sistema de letras.

Pruebas de recópula

Se realizaron cuatro tipos de pruebas que difirieron en las líneas utilizadas. En tres de ellas, se liberaron 50 machos de una sola de las líneas de laboratorio con 50 machos y 50 hembras silvestres SanP y son referidas como **Seib***, **Cast** y **Cast*** indicando el origen de los machos de la línea de laboratorio utilizada y si eran fértiles o estériles. La cuarta prueba consistió en la liberación de 25 machos de todas las líneas de laboratorio, 25 machos y 50 hembras SanP y es referido como **Mix**.

El estudio se llevó a cabo en seis días y se realizaron entre dos y tres réplicas de cada prueba por día dependiendo de la disponibilidad de material. Cada mañana, aproximadamente a las 7.15 hs. se liberaban los machos dentro de cada jaula y luego de 15 minutos, las hembras reemplazando aquellos individuos muertos o débiles cuando había material suficiente. Una vez liberadas las hembras y durante 10 horas se observaba el comportamiento de las moscas en la jaula. Para cada cópula se registró: la hora de inicio, la ubicación de la pareja al momento de detectar la cópula, el origen del macho y la letra y color del rótulo de la hembra. La pareja era colectada en un tubo plástico y colocada a la sombra dentro de la jaula hasta que se separaran libremente. Una vez que se separaban las moscas, se registraba la hora de finalizada la cópula y se procedía a la re-liberación de las moscas dentro de la jaula. Finalizadas las diez horas de observación se retiraban todas las moscas de la jaula y se registraban cuáles eran las hembras recuperadas.

Análisis de datos

Las condiciones generales del experimento fueron evaluadas a través del porcentaje de cópula alcanzado en cada réplica. Aquellas réplicas con valores menores al 20% fueron eliminadas siguiendo lo sugerido en el Manual de Control de Calidad (IAEA 1998) para pruebas de jaula de campo. Las posibles diferencias en el número de hembras reapareadas en función del origen del primer macho fueron analizadas a través de un test de χ^2 de Homogeneidad considerando primero diferencias entre machos SanP y de laboratorio. Luego se evaluaron posibles diferencias entre cada línea en particular y la población SanP. Para determinar la influencia de los distintos aspectos de la primera cópula en la probabilidad de que la hembra recopule, se realizó un análisis de regresión

logística múltiple similar al presentado en el estudio del comportamiento de recópula bajo condiciones de laboratorio. Las variables independientes en este caso fueron: la hora de inicio, el tiempo de duración de la cópula y el origen del macho desglosado en tres nuevas variables (SanP vs. laboratorio, fértil vs. estéril y las cuatro categorías por separado). Las variables dependientes, inicio y duración de la primera cópula, fueron estandarizadas al día para remover cualquier efecto causado, en dichas variables, por las variaciones ambientales entre días. Se estimó una regresión para cada tratamiento y para todos los datos en su conjunto, y se empleó el procedimiento *backward* de remoción de variables que no aportan al modelo. Cuando alguna de las variables independientes resultó significativa en el modelo de regresión se realizaron análisis posteriores para interpretar el sentido biológico de dicha asociación.

Se evaluó la posible correlación entre el período refractario y el tipo de macho, y entre el período refractario y la duración de la primera cópula, mediante una correlación de rangos de Spearman. El efecto del tipo de macho fue también analizado mediante un ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido, en caso de resultar estadísticamente significativo, de comparaciones múltiples de Dunn.

Se analizó el grado de preferencia por parte de la hembra en la elección del segundo macho luego de la primera cópula. Se determinaron posibles diferencias entre la duración de la primera cópula y la segunda en una misma hembra mediante un test de *t* para muestras pareadas. Las comparaciones se realizaron sólo entre hembras apareadas en la primera y segunda cópula con machos del mismo origen para evitar cualquier posible efecto de las hembras o del origen del macho en esta variable.

Resultados

Compatibilidad entre líneas y primera cópula

En todos los tratamientos los porcentajes medios de cópula fueron mayores al 40% (Media \pm desvío estándar (N): 40.38 \pm 9.22 (16); 48.00 \pm 9.67 (11); 47.7 \pm 10.36 (15) y 46.40 \pm 9.32 (10), para las pruebas Seib*, Cast, Cast* y Mix respectivamente). Los machos de laboratorio mostraron buena participación en los apareamientos y en

particular los machos Cast mostraron mejor desempeño que los machos SanP. En el tratamiento Cast, 69.88% de las cópulas involucraron machos Cast y el resto machos SanP. La irradiación redujo estos niveles de apareamiento, llegando los machos Cast* a obtener un 55.23% de los apareamientos en el tratamiento Cast*. Los machos Seib* mostraron niveles de competitividad para el apareamiento similares a los informados, para esa misma línea, por Cayol *et al.* (1999). Con respecto a la duración de la primera cópula también se observó un efecto del origen del macho. Las cópulas de los machos Seib* fueron significativamente menores que las de los machos Cast, Cast* y SanP ($P < 0.05$). No se detectaron diferencias en la duración debidas al proceso de esterilización. Cladera *et al.* (2002) presentan un análisis más detallado de la competitividad de los distintos machos y de las implicancias para el posible uso de la línea Cast-191 en programas de control con TIE.

Tasa de recópula en hembras SanP

Para todos los orígenes de machos analizados, se registraron casos de hembras con más de una cópula. El valor máximo, en las diez horas de observación, fue de tres cópulas. En la prueba Mix no se registraron recópulas en las hembras apareadas con machos SanP. En las otras tres pruebas, el número medio de cópulas por hembra fue en todos los casos menor si el macho era SanP (Tabla 5.15). Asimismo dentro de las líneas de laboratorio, las hembras apareadas con machos Seib* presentaron el menor valor, las hembras apareadas con machos Cast* el mayor, y las apareadas con machos Cast presentaron valores intermedios. La prueba Mix confirmó la tendencia observada en las otras tres pruebas.

Prueba	Origen del primer macho			
	SanP	Seib*	Cast	Cast*
Seib*	1.04 ± 0.21 (158)	1.12 ± 0.33 (108)	-	-
Cast	1.14 ± 0.39 (70)	-	1.17 ± 0.40 (143)	-
Cast*	1.13 ± 0.36 (130)	-	-	1.18 ± 0.44 (157)
Mix	1.00 ± 0.00 (50)	1.10 ± 0.30 (21)	1.12 ± 0.32 (78)	1.18 ± 0.43 (57)
Todos	1.08 ± 0.29 (408)	1.12 ± 0.32 (129)	1.15 ± 0.37 (221)	1.18 ± 0.43 (214)

Tabla 5.15: Número medio de cópulas por hembra ± desvío estándar (N) para cada prueba, a lo largo de diez horas de observación según el origen del primer macho.

Además de registrarse un mayor número de cópulas por hembra en función del origen del macho, se observó una tendencia hacia una mayor tasa de recópula en las hembras apareadas con machos de laboratorio en comparación con hembras apareadas con machos SanP (Tabla 5.16).

Prueba	Macho	Hembras no reapareadas	Hembras reapareadas	Porcentaje de recópula (%)
Seib*	SanP	151	7	4.4
	Seib*	95	13	12.0
Cast	SanP	61	9	12.9
	Cast	119	24	16.8
Cast*	SanP	114	16	12.3
	Cast*	131	26	16.6
Mix	SanP	50	0	0.0
	Seib*	19	2	9.5
	Cast	69	9	11.5
	Cast*	48	9	15.8
Todos	SanP	376	32	7.8
	Seib*	114	15	11.6
	Cast	179	35	16.4
	Cast*	188	33	14.9

Tabla 5.16: Tasa de recópula para las hembras apareadas con machos SanP o de laboratorio dentro de cada prueba. Promedio para el conjunto de los datos.

Esta tendencia que se observó en las tres pruebas que involucraron una sola línea de laboratorio, fue confirmada en la prueba Mix. Cuando se comparó la tasa de recópula en todo el conjunto de datos, se observó que estas diferencias eran estadísticamente significativas ($\chi^2_{(1)} = 12.46$, $P = 0.006$). Las comparaciones de a pares mostraron que estas diferencias alcanzan significación entre los machos SanP y Cast ($\chi^2_{(1)} = 7.77$, $P = 0.005$), y entre los machos SanP y Cast* ($\chi^2_{(1)} = 10.58$, $P = 0.001$). Las otras comparaciones resultaron no significativas.

La hora de inicio y la duración de la primera cópula mostraron un efecto significativo en la propensión a la recópula en las cuatro pruebas en el análisis de regresión logística múltiple (Tabla 5.17). Al contrario de lo observado cuando se analizó la tasa de recópula, mediante un test de χ^2 , en este caso, el origen del macho no presentó coeficientes parciales significativos en la regresión logística. Recién cuando se analizaron los datos de todas las pruebas en forma conjunta y se agruparon los machos

de laboratorio en una sola categoría se observó un efecto en la propensión a la recópula según el origen del macho (Tabla 5.17).

Prueba	χ^2	gl	P	VARIABLES INVOLUCRADAS (P)
Seib*	25.21	2	< 0.0001	Inicio (< 0.001) y Duración (< 0.001)
Cast	28.72	2	< 0.0001	Inicio (< 0.001) y Duración (< 0.001)
Cast*	17.64	2	< 0.001	Inicio (< 0.001) y Duración (0.048)
Mix	6.87	2	0.032	Inicio (0.037) y Duración (0.043)
Todas	70.37	3	< 0.0001	Inicio (< 0.0001), Duración (< 0.0001) y Origen ¹ (0.034)

Tabla 5.17: Valores de χ^2 del modelo de regresión logística para hembras de la población SanP en las cuatro pruebas realizadas bajo condiciones de jaula de campo. ¹SanP vs. Laboratorio.

Aquellas hembras que se aparearon más temprano, o que su primera cópula fue corta, tendieron a reaparearse más que aquellas que lo hicieron por primera vez tarde, o que tuvieron una primera cópula larga. Con respecto a la hora de inicio estas diferencias fueron significativas para los machos SanP ($t = 4.07$, $P = 0.0001$), Cast ($t = 3.10$, $P = 0.002$), y Cast* ($t = 2.30$, $P = 0.022$). Los machos Seib* mostraron la misma tendencia pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($t = 1.27$, $P = 0.205$). No se detectó ningún efecto del origen del macho en la hora de inicio de las cópulas tanto para las hembras que no reaparearon como para las que sí lo hicieron (Tabla 5.18).

Macho	1 ^{era} No reap.	1 ^{era} Reap.	2 ^{da}
SanP	11:59 ± 2:38 (376)	9:55 ± 1:07 (32)	14:40 ± 2:04 (44)
Seib*	11:39 ± 2:13 (114)	10:37 ± 2:01 (15)	13:50 ± 1:18 (10)
Cast	11:54 ± 2:37 (188)	10:25 ± 1:47 (33)	14:24 ± 2:06 (31)
Cast*	11:55 ± 2:26 (179)	10:37 ± 1:55 (35)	14:15 ± 1:43 (30)

Tabla 5.18: Hora de inicio de la primera y segunda cópula según el origen del macho. Media ± desvío estándar (N). Para la primera cópula las hembras fueron agrupadas en reapareantes (reap.) y no reapareantes (no reap.).

El efecto de la duración de la primera cópula en la propensión a la recópula no fue igual para los distintos machos (Tabla 5.19). Los valores medios de duración de la primera cópula de las hembras apareadas con machos SanP o Cast* no difirieron entre hembras que se reaparearon y hembras que no lo hicieron, por lo que la duración de la primera cópula no afectó la propensión a la recópula. En el caso de las cópulas que involucraron machos Cast y Seib* se manifestó una asociación entre ambas variables. Las hembras

reapareantes tuvieron una primera cópula significativamente más corta que las no reapareantes ($t = 3.09$, $P = 0.002$ para Cast y $t = 2.32$, $P = 0.021$ para Seib*).

Macho	1 ^{era} No reap.	1 ^{era} Reap.	2 ^{da}
SanP	3:08 ± 1:01 (371)	2:58 ± 1:07 (32)	2:22 ± 0:52 (44)
Seib*	2:39 ± 0:52 (114)	2:01 ± 0:53 (15)	1:30 ± 0:52 (10)
Cast	3:19 ± 1:06 (183)	2:31 ± 1:06 (32)	2:03 ± 0:49 (28)
Cast*	2:58 ± 0:56 (177)	2:46 ± 1:32 (35)	1:57 ± 0:56 (30)

Tabla 5.19: Duración de la primera y segunda cópula según el origen del macho. Media ± desvío estándar (N). Para la primera cópula las hembras fueron agrupadas en reapareantes (reap.) y no reapareantes (no reap.).

La duración de la primera cópula estuvo negativamente correlacionada con la hora de inicio de la cópula (Figura 5.3) tanto para hembras que reaparearon (correlación de rangos de Spearman, $r = -0.28$, $P = 0.003$), como para las que no lo hicieron ($r = -0.34$, $P < 0.0001$). Esta misma tendencia fue observada para cada tipo de macho (datos no mostrados, $P < 0.05$).

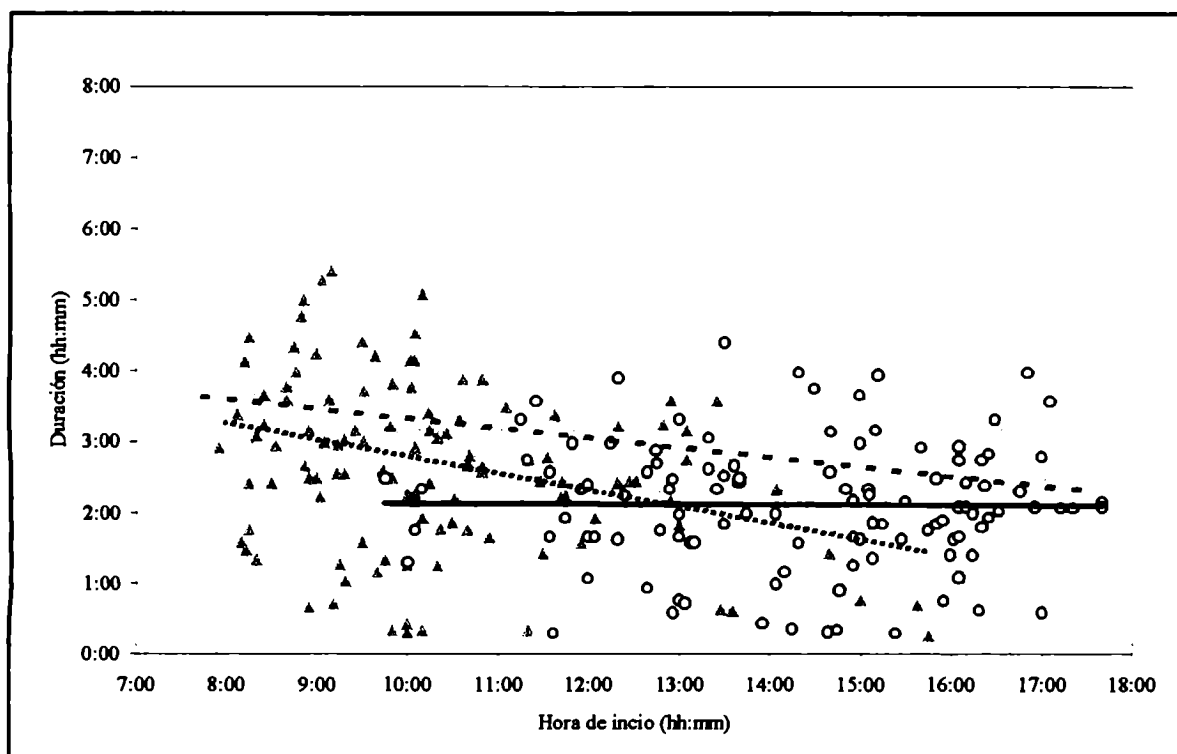


Figura 5.3: Relación entre la hora de inicio de la cópula y la duración de la cópula para la primer cópula de hembras que no reaparearon (cruz gris, línea a rayas), de hembras que sí reaparearon (triángulos grises, línea punteada) y para la segunda cópula (círculos blancos, línea continua).

Período refractario

El período refractario varió en función del origen del primer macho y estas diferencias fueron altamente significativas tanto para la correlación de rangos de Spermann ($r = -3.41$, $P = 0.001$) como para el ANOVA de KruskalWallis ($H_{(3)} = 15.90$, $P = 0.001$). Las hembras apareadas con machos Cast* presentaron el menor valor (Tabla 5.20) y este fue significativamente menor que los valores observados para machos SanP ($P < 0.005$) y para machos Cast ($P < 0.05$). Por otra parte el período refractario no se vio asociado con la duración de la primera cópula. ($r = -0.11$, $P = 0.264$).

Macho	Q ₂₅	Mediana	Q ₇₅	N
SanP	0:51	1:36 a	2:35	33
Seib*	0:20	0:50 ab	1:19	15
Cast	0:30	1:20 a	1:55	33
Cast*	0:16	0:27 b	1:01	35

Tabla 5.20: Período refractario en función del origen del primer macho. Mediana, 1^{er} y 3^{er} cuartiles y número de casos. Los valores seguidos de una letra distinta difieren significativamente según el test de comparaciones múltiples de Dunn.

Segunda cópula

El patrón de elección de apareamiento no se modificó entre la primera y segunda cópula (Tabla 5.21). La proporción de hembras apareadas con machos de laboratorio o con machos SanP fue igual para ambas cópulas en todas las pruebas ($\chi^2_{(1)} = 1.62$, $P = 0.204$; $\chi^2_{(1)} = 0.07$, $P = 0.786$; $\chi^2_{(1)} = 0.20$, $P = 0.657$ y $\chi^2_{(3)} = 5.99$, $P = 0.112$; para las pruebas Seib*, Cast, Cast* y Mix respectivamente).

Prueba Macho	Seib*		Cast		Cast*		Mix			
	Seib*	SanP	Cast	SanP	Cast*	SanP	Seib*	Cast	Cast*	SanP
1 ^{era} no-reap.	95	151	119	61	131	114	19	69	48	50
1 ^{era} reap.	13	7	24	9	26	16	2	9	9	0
2 ^{da} cópula	9	11	23	10	24	18	1	8	7	6

Tabla 5.21: Número de cópulas para cada tipo de macho considerando para la primera cópula si la hembra reapareo o no, y para la segunda cópula todos los casos juntos. Se indica sólo el origen del macho porque todas las hembras eran SanP.

La duración de la segunda cópula resultó menor que la primera (Tabla 5.19) y estas diferencias fueron altamente significativas ($t = 3.08$, $P = 0.003$). Al contrario que para la

primera cópula, la duración de la segunda cópula no estuvo correlacionada con la hora de inicio (Figura 5.3, correlación de rangos de Spearman, $r = -0.01$, $P > 0.05$).

5.4 Discusión

En este capítulo se analizó el comportamiento de recópula en hembras de *Ceratitis capitata* provenientes de distintas líneas de laboratorio bajo condiciones de laboratorio y en hembras silvestres bajo condiciones de jaulas de campo. En ambos estudios se liberaron hembras con la metodología de marcado individual lo que permitió analizar el comportamiento de cada hembra en presencia de otras, simulando condiciones más naturales que en trabajos previos donde cada hembra era colocada en un frasco, aislada de las otras (Bloem *et al.* 1993ab, Saul y McCombs 1993ab, Miyatake *et al.* 1999). Para el estudio realizado bajo condiciones de laboratorio, el protocolo propuesto permitió obtener información detallada tanto en machos como en hembras. En el caso de las jaulas de campo, fue posible analizar distintos aspectos del comportamiento post-copulatorio y de la propensión a la recópula, aún cuando el número de hembras reapareantes fue bajo (aproximadamente 10%), y el período de observación relativamente corto (10 hs. a lo largo de un día). Se observó la presencia de cópulas múltiples en todas las hembras analizadas confirmando que este comportamiento es común tanto en hembras de laboratorio como silvestres en coincidencia con lo informado en otros estudios (Katiyar y Ramirez 1970, Nakagawa *et al.* 1971, Bloem *et al.* 1993ab, Farias *et al.* 1972, Saul *et al.* 1988, Blay y Yuval 1997, Cavalloro & Delrio 1970, McInnis 1993, Yuval *et al.* 1996, McInnis *et al.* en prensa).

Condiciones experimentales

En las pruebas en el laboratorio, la densidad de moscas en la caja fue uno de los factores que determinaron la tasa de reapareamiento. Este hecho pone en evidencia la importancia de considerar el diseño experimental en el momento de comparar resultados entre distintos experimentos como ya ha sido propuesto por Fowler y Partridge (1989). La alta tasa de recópula en las cajas con alta densidad de moscas se puede deber a la gran cantidad de machos dispuestos a la cópula y a la dificultad de la hembra de rechazar cortejos sin entrar en comportamientos de pelea (Calcagno 2001). Sería

interesante analizar a campo si la liberación de grandes cantidades de machos estériles, como sucede en las áreas donde esta plaga se controla con la TIE, genera una presión que aumente el nivel de recópula de las hembras silvestres.

Diferencias entre hembras de distinto origen

Asimismo, en dichas pruebas, se observó una diferencia entre líneas con respecto a la tasa de recópula y al número de cópulas alcanzadas por cada sexo a lo largo del experimento. Particularmente las hembras Gua-98 presentaron una tasa de recópula mayor y una tendencia hacia un mayor número de cópulas que las hembras Pet-84. Es interesante notar, que *a priori* se hubiera esperado una mayor propensión a la recópula en hembras Pet-84 que en hembras Gua-98. El mayor número de generaciones bajo cría artificial de Pet-84, habría aumentado la receptividad, en Pet-84, y consecuentemente la propensión a la recópula. Sin embargo esto no fue así, sugiriendo que durante el proceso de colonización a la cría en el laboratorio se pueden producir distintas presiones de selección que deriven en comportamientos diferenciales entre líneas (Saul y McCombs 1993b). Esto pone de relieve, además, que los cambios que se producen luego de la importante reducción en la variabilidad genética que ocasiona la introducción de una línea en la cría de laboratorio, probablemente tengan lugar en las primeras generaciones (Liedo *et al.* 2001). Por otra parte, no se pueden descartar factores propios de las poblaciones de origen, ya que, si bien ambas líneas se originaron con poblaciones silvestres de Guatemala, las mismas provinieron de distintas regiones. McInnis *et al.* (en prensa) encontraron, en experiencias de jaula de campo, que las hembras silvestres mostraron una tendencia a una tasa de recópula menor que las hembras de cinco líneas de laboratorio analizadas bajo las mismas condiciones. Este hecho muestra que las condiciones de laboratorio favorecen la recópula. En el presente capítulo se analizaron hembras silvestres y de laboratorio en dos estudios diferentes. Las condiciones de los mismos difirieron por lo que no fue posible determinar si la tasa de recópula era mayor en hembras de laboratorio que en hembras silvestres.

Origen del macho en la primera cópula

En los dos estudios realizados, se observó una tendencia hacia una mayor tasa de recópula si el macho era de laboratorio en vez de silvestre. Las diferencias fueron

estadísticamente significativas para las hembras de la población silvestre de SanP, y para las hembras Pet-84. El hecho de que la tasa de recópula fuese máxima en hembras Pet-84 apareadas por primera vez con machos Pet-84, disminuyera con machos Gua-98 o AnPet y fuera igual a cero con machos Ant, sugiere que la reducción de la receptividad en la hembra es más eficiente en machos de poblaciones silvestres o con reciente introducción al laboratorio comparada que en machos de líneas con varios años de cría en el laboratorio. Las hembras SanP, también mostraron una mayor propensión a la recópula luego de haberse apareado con machos de laboratorio, que cuando lo hicieron con machos silvestres. Si bien esta tendencia ya había sido informada (Bloem 1993ab, Hendrichs *et al.* 1996, McInnis *et al.* en prensa), los resultados presentados aquí, son los primeros en señalar una diferencia estadísticamente significativa entre machos silvestres y machos de laboratorio en su capacidad de inhibir la propensión a la recópula en las hembras. Esta tendencia no se evidenció para hembras Gua-98, mostrando nuevamente diferencias entre líneas. Sin embargo, no es posible aún descartar el efecto del origen del macho en esta línea ya que las hembras Gua-98 fueron apareadas solo con machos Gua-98 o Pet-84 y no con machos AnPet o Ant.

El conjunto de los resultados muestra que los machos de laboratorio pueden sufrir modificaciones que cambian su efecto sobre el comportamiento post-copulatorio de las hembras y representan un alerta a tener en cuenta al evaluar la efectividad de la TIE en *C. capitata*. La pérdida en la capacidad de reducir la receptividad, en las pruebas bajo condiciones de laboratorio, estaría asociada al número de generaciones bajo cría de laboratorio, en coincidencia con McInnis *et al.* (en prensa), sugiriendo que estos cambios podrían estar asociados a altos niveles de endocría y podrían ser removidos con la adición de material genético silvestre mediante lo que se conoce como *refresco* de una línea.

Hora de inicio de la primera cópula

En las pruebas realizadas en jaulas de campo se observó una asociación entre la propensión a la recópula y la hora de inicio de la primera cópula, sugiriendo que el nivel de actividad de la hembra podría ser un factor importante en la propensión a la recópula. Este comportamiento puede ser muy frecuente durante los primeros días de madurez

sexual como se reportó en otros trabajos (Yuval *et al.* 1996, Blay y Yuval 1997, Blay y Yuval 1999). En días subsiguientes, la actividad de cópula y recópula probablemente disminuyan dando lugar a otras actividades como la oviposición. Las hembras Gua-98 mostraron esta asociación entre la hora de inicio y la propensión a la recópula bajo condiciones de laboratorio ($P = 0.018$), mientras que las hembras Pet-84 no lo hicieron ($P > 0.05$, datos no mostrados). Sería interesante considerar si no es el diseño experimental el que determina esta asociación. El hecho de haber mantenido a las hembras vírgenes, hasta una edad que garantice una gran cantidad de hembras sexualmente maduras, pudo haber sobre-estimulado a las hembras que maduran más temprano, y hacerlas más receptivas, llevándolas a aparearse muy temprano y luego recopular. En este sentido, un estudio que involucre observaciones diarias desde la emergencia de los adultos brindará información que se podría aproximar más a lo que sucede en el campo.

Duración de la primera cópula

La duración de la primera cópula mostró una asociación compleja con la propensión a la recópula. En las pruebas de laboratorio la asociación fue significativa para hembras Pet-84 en condiciones de baja densidad y particularmente cuando se aparearon con machos Pet-84. Hembras con cópulas más cortas reaparearon en mayor proporción que hembras con cópulas más largas. Por el contrario, en las hembras Gua-98 las cruza que involucraron machos Gua-98 fueron más largas en las hembras que luego reaparearon en comparación con las que no lo hicieron. Este hecho podría estar indicando que, en el caso de los machos Gua-98, una cópula prolongada no implica una mayor transferencia de espermatozoides o productos de glándulas accesorias (PGAs), sino, por el contrario, una dificultad para hacerlo, al menos, en un período de tiempo adecuado. Es interesante señalar que las posibles asociaciones entre la propensión a la recópula y la duración de la primera cópula, se pusieron de manifiesto para cópulas homotípicas y en condiciones de baja densidad. Asimismo, para la cruce Gua-98 x Gua-98 de las hembras no reapareante, se observó una mayor duración de la cópula en las cajas con alta densidad de moscas que en las cajas con baja densidad. Este hecho podría coincidir con lo informado por Gage (1991) donde el contexto social, presencia de otros machos, produjo un aumento en la cantidad de espermatozoides transferido. En las pruebas en jaulas de

campo, la relación entre la duración de la primera cópula y la propensión a la recópula dependió del origen del macho. En este caso, los machos silvestres (SanP) y los machos Cast* (Cast 191 irradiados) no mostraron una asociación significativa, mientras que los otros machos sí la mostraron. Saul *et al.* (1988) señalaron la importancia de la duración de la cópula en la tendencia a la recópula, pero sus conclusiones se basaron en estudios donde se produjo la separación forzada de las parejas mientras que, en este trabajo, la duración de la cópula no estuvo limitada externamente.

Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que no siempre existe una relación directa entre la duración de la primera cópula y la propensión a la recópula. La duración de la cópula no debe ser considerada una variable simple ya que involucra distintos componentes o fases que se pueden suceder en forma secuencial. Estos componentes son: la intromisión, que implica posicionar el aedeagus en el lugar correcto de la bolsa copulatoria de la hembra (Eberhard y Pereira 1995), la transferencia de esperma y de los productos de las glándulas accesorias (PGAs), y posiblemente, una fase de postura guardiana (Alcock 1994, Parker 1970, 1998). De todas estas fases, la cantidad de esperma acumulado en la espermateca y la transferencia de PGAs están asociadas con la inhibición de la recópula (Delrio y Cavalloro 1979, Miyatake *et al.* 1999). La acumulación de esperma presenta una relación con el tiempo de cópula similar a una campana de Gauss (Seo *et al.* 1990) y, más aún, Taylor *et al.* (2001b) sugirieron la ausencia de una relación lineal entre las dos variables, concluyendo, incluso, que la duración de la cópula no debe ser tomada como una medida directa del éxito copulatorio de los machos. En este caso, se propone que la duración de la primera cópula no debe ser utilizada como una variable para predecir la propensión a la recópula de las hembras. Al menos, no sin tener en cuenta el origen del primer macho.

Como la duración de la cópula es una variable que en *C. capitata* está correlacionada con el origen del macho (Cayol *et al.* 1999, Field *et al.* 1999, McInnis *et al.* en prensa) entre otros factores (Field y Yuval 1999, Field *et al.* 1999), es difícil determinar si el efecto del origen del macho en la tasa de recópula está generado solamente por las diferencias en la duración de la cópula o si existe un factor intrínseco al origen. En las hembras Pet-84 el orden en que se ubican los machos de las distintas líneas,

clasificándolos de mayor a menor en su capacidad de inhibir la recópula, cuando resulta significativa la asociación entre la tasa de recópula y el origen del macho (condiciones de alta densidad) o cuando resulta significativa la asociación entre la tasa de recópula y la duración de la primera cópula (condiciones de baja densidad) son coincidentes (Ant - AnPet - Gua-98 - Pet-84 de mayor a menor en capacidad de inhibir la recópula). Esto sugiere una posible asociación entre duración y origen en relación con la tasa de recópula. Sin embargo, los resultados encontrados para las hembras Gua-98 y las hembras SanP, no aportan la misma evidencia. En particular las hembras SanP mostraron una tasa de recópula mayor luego de aparearse por primera vez con machos Cast que con machos SanP, aún cuando el tiempo de cópula entre estos dos orígenes fue el mismo (Cladera *et al.* 2002). Las hembras Gua-98 mostraron la misma tasa de recópula luego de aparearse con machos Pet-84 o con Gua-98, aún cuando la duración en este caso no fue la misma entre orígenes. Saul *et al.* (1988) mostraron un posible efecto del origen del macho en la tasa de recópula no relacionado con la duración de la cópula, si bien no se reporta la significación estadística de esta asociación. Estos resultados, en su conjunto, sugieren que el origen del macho tiene un efecto intrínseco en la propensión a la recópula además del que se observa asociado a la duración de la cópula.

Por otra parte, la falta de asociación entre la duración de la primera cópula y la propensión a la recópula en las hembras apareadas con machos Cast*, y el hecho que esto no sucedió en las hembras apareadas con machos Cast, sugiere que el proceso de esterilización modifica la dinámica de la cópula o alguna etapa dentro de esta, relacionada con la duración de la cópula, y que afecta la propensión a la recópula. Sin embargo, hay que tomar esta idea con precaución ya que para machos Cast* se observó una tendencia hacia cópulas más cortas en hembras reapareantes que en no reapareantes. Lamentablemente, no fue posible contar con machos Seib 6-96 fértiles o SanP irradiados para poner a prueba esta hipótesis.

Estado copulatorio del macho de la primera cópula

Cuando se analizó con mayor detalle el efecto del estado copulatorio del macho en la propensión a la recópula de las hembras Gua-98, se observó que a medida que transcurre el experimento, la probabilidad de encontrar machos vírgenes exitosos

disminuye, debido al diseño sin reposición de individuos. Este incremento de machos no vírgenes acompañado del hecho de que a medida que transcurre el experimento las hembras tienen menos tiempo para mostrar una tendencia a la recópula puede haber sido, en este caso, la causa por la cual el estado copulatorio del macho haya resultado significativo en la regresión logística. Cuando se analizan las cópulas obtenidas el primer día solamente se ve que esta variable no resulta significativa (datos no mostrados) por lo que es probable que la tendencia observada sea un artificio del diseño experimental. Sin embargo, la ausencia de esta tendencia en hembras Pet-84 no apoya esta idea por lo que no es posible determinar con los resultados de este estudio el verdadero efecto del estado copulatorio del macho en la propensión a la recópula.

Período refractario

Tanto para hembras como para machos, el período refractario entre la primera y la segunda cópula, estuvo correlacionado con el número de cópulas que alcanzó cada individuo a lo largo del experimento. Este hecho muestra que el nivel de actividad sexual de la hembra puede ser un factor determinante de la propensión a la recópula. Una primera cópula no exitosa, ya sea por la falta de transferencia de esperma o PGAs, puede resultar en un período refractario corto. Si el segundo macho logra reducir eficientemente la receptividad de la hembra, siendo más exitoso que el primero, esa hembra no debería volver a aparearse. La alta correlación encontrada sugiere entonces, que las hembras que se aparearon muchas veces presentaron un nivel de actividad elevado aún luego de la primera cópula. Para los machos la interpretación es similar, aquellos que presentaron un nivel de actividad elevado, lo hicieron desde la primera cópula.

En ningún caso se detectó un efecto del origen del macho en el período refractario de la hembra. Este hecho es llamativo ya que para hembras Pet-84 y SanP, se encontró un efecto del origen del macho en la propensión a la recópula, por lo que era de esperar que el período refractario también se haya visto afectada por el origen del macho. Cuando se analizó el período refractario de las hembras que se aparearon por segunda vez el mismo día en que se aparearon por primera vez, se observó que las hembras Pet-84 presentaron

el menor valor, lo cual también se contradice con el hecho que dichas hembras presentaron una tasa de recópula menor que las hembras Gua-98.

Con respecto a las pruebas en jaulas de campo, se encontró un fuerte efecto de la irradiación. Esto tiene implicancias directas sobre la TIE. Los resultados presentados por Bloem *et al.* (1993b) fueron opuestos. Ellos no encontraron una disminución del período refractario debida al proceso de irradiación. Sin embargo, en dicho trabajo las hembras apareadas con machos irradiados mostraron una mayor propensión a la recópula. En este trabajo no se observó una mayor propensión a la recópula en hembras apareadas con machos Cast* en comparación con hembras apareadas con machos Cast ($\chi^2_{(1)} = 0.17, P = 0.683$). La interpretación de estas diferencias se ve dificultada por el hecho de que la tasa de recópula se midió con dos metodologías muy distintas (30 días con observaciones día por medio, en el trabajo referido, vs. 10 hrs. de observación un solo día, en el presente trabajo). Sin embargo, los dos estudios mostraron al menos algún efecto de la irradiación sobre el comportamiento de recópula. Además, no se deben subestimar posibles diferencias entre cepas. Las diferencias en los períodos refractarios de los machos Cast* y SanP, junto a la menor propensión a la recópula en hembras apareadas con machos silvestres respecto a aquellas apareadas con machos de laboratorio resultan una evidencia de que los cambios que se suceden en los machos de laboratorio debidos a los procesos de cría afectan el comportamiento de recópula de las hembras silvestres.

Asimismo, no se observó ninguna correlación entre el período refractario y la duración de la primera cópula, aún cuando se analizaron tres tipos de hembras distintas y al menos seis tipos de machos. Trabajos previos, realizados con cópulas interrumpidas mostraron un efecto de la duración en el período refractario asociado al origen del macho (Saul *et al.* 1988). Nuevamente, el hecho de haber interrumpido las cópulas pudo generar una relación artificial entre la duración y, en este caso, el período refractario. Si bien no se sabe qué fase o etapa de la primera cópula determina la duración del período refractario (cantidad de esperma o PGAs transferido, cortejo copulatorio, postura guardiana u otros), los resultados sugieren que dicha fase, o al menos su efecto sobre el período refractario, no se correlaciona con la duración de la cópula.

Elección de apareamiento para la segunda cópula

Con respecto al patrón de elección de pareja luego de la primera cópula, los resultados de los dos estudios no fueron congruentes en todos los aspectos. Las hembras Pet-84 no vírgenes se aparearon en mayor proporción con machos de su mismo origen que las hembras Pet-84 vírgenes. Estudios realizados en una especie de *Drosophila* mostraron que hembras apareadas con machos de su misma especie mostraron una mayor preferencia por machos conespecíficos en una segunda cópula que hembras vírgenes o apareadas con machos de una especie cercana, sugiriendo un efecto de la experiencia previa en la elección de pareja para una segunda cópula (O'Hara *et al.* 1976). La forma por la cual las hembras Pet-84 reconocen a los machos de su propia línea con respecto a la otra y los motivos por los cuales prefieren machos de un origen sobre otro son aún desconocidos. En condiciones de baja densidad el desempeño relativo de las hembras Pet-84 fue menor y no se observó una preferencia hacia un macho en particular. Este desempeño pobre podría deberse a la baja propensión a la recópula mostrada por estas hembras en condiciones de baja densidad. Una hembra al reaparearse podría no solo modificar su patrón de elección en el apareamiento, sino incluso utilizar el esperma de los distintos machos, para fecundar sus huevos, en forma diferencial. Yuval *et al.* (1996) y Taylor *et al.* (2000, 2001b) mostraron una acumulación asimétrica de esperma en las espermatecas de *C. capitata*, dando lugar a un posible manejo del eyaculado por parte de las hembras y posiblemente de selección sexual post-copulatoria (Eberhard y Cordero 1995, Eberhard 1996). Este cambio, sin embargo, no se registró en hembras SanP o Gua-98, sugiriendo que, al menos en cópulas que se suceden muy pronto, los machos de laboratorio son igualmente competitivos para aparearse con hembras (silvestres, o Gua-98) no vírgenes como lo son para aparearse con hembras vírgenes de esos orígenes. Sería de interés práctico determinar si esta falta de cambio en el patrón de elección de pareja se mantiene a lo largo de toda la vida de la hembra. Un estudio de este tipo debería ser considerado prioritario dentro de los estudios que se realizan en apoyo a la TIE.

Duración de la cópula y estado copulatorio de los individuos

El estado copulatorio de los individuos afectó la duración de la cópula. Las cópulas de las hembras no vírgenes fueron más cortas que las de las hembras vírgenes. Esta

tendencia se manifestó en las hembras apareadas con machos Gua-98, pero no en hembras apareadas con machos Pet-84. Estos resultados siguen indicando que hay diferencias entre líneas, tanto en los machos como en las hembras. Estas diferencias podrían estar afectando la dinámica de transferencia de espermatozoides y, por lo tanto, el comportamiento post-copulatorio y la propensión a la recópula.

Para las hembras SanP también se observó que la segunda cópula dura menos que la primera, en coincidencia con lo informado por McInnis *et al.* (en prensa). Sin embargo, en dicho trabajo, no se conjeturaron posibles causas. La presencia de una fuerte correlación negativa entre la hora de inicio y la duración de la cópula sugiere que las cópulas se hacen más cortas a medida que el período de máxima actividad sexual finaliza. Como las segundas cópulas en las pruebas en jaulas de campo ocurrieron el mismo día que las primeras, sería posible postular que la diferencia en duración se deba solamente a que comenzaron más tarde. Sin embargo, no se encontró una correlación entre la hora de inicio y la duración de la segunda cópula. Notablemente, muchas de estas segundas cópulas comenzaron a la misma hora que algunas primeras cópulas de otras hembras en las que sí se observó esta asociación (Figura 5.3). Asimismo, la primera cópula de las hembras que no reaparearon fueron siempre más largas en promedio, que la segunda cópula de las hembras que reaparearon, para cualquier hora de inicio durante el período de observación. La máxima diferencia entre la duración media de la primera y segunda cópula se registró a las diez de la mañana y fue de una hora y media. Este tiempo extra en la primera cópula sugiere que, al menos una de las fases de la cópula, es más corta en la segunda cópula o incluso está ausente. Esta fase hipotética podría estar relacionada con la pérdida de la virginidad donde el macho necesita tiempo para romper o forzar su camino a través de alguna barrera física, o con la reducción de la receptividad ya sea a través de la transferencia de PGAs (Delrio y Cavalloro 1979, Miyatake *et al.* 1999), del despliegue de algún tipo de cortejo copulatorio (Eberhard 2000) o de una postura guardiana (Alcock 1994, Simmons y Siva-Jothy 1998). El hecho de que este tiempo extra, presente en la primera cópula, esté correlacionado negativamente con la hora de inicio de las cópulas, sugiere que la reducción en la receptividad, al menos en un corto plazo, sea la causa más posible. A medida que el período de máxima actividad sexual termina, el tiempo extra puede

disminuir sin que ese macho corra el riesgo de que la hembra recopule y, por lo tanto, vea disminuido su éxito reproductivo. Se puede pensar que este tiempo extra minimizaría la competencia espermática (Parker 1970, 1998, Simmons y Siva-Jothy 1998).

Esta hipótesis, sin embargo, tiene supuestos fuertes. Uno es que los machos son capaces de distinguir entre hembras vírgenes y hembras no vírgenes luego de comenzada la cópula. En presencia de hembras no vírgenes el macho 'decide' ahorrar ese tiempo 'extra' que debería emplear para reducir la receptividad de la hembra. Miyatake *et al.* (1999) mostraron que la proporción de hembras que ven reducida su receptividad por la transferencia de los PGAs se mantuvo constante a lo largo de la vida del grupo de hembras analizadas, lo cual puede significar que la acción de los PGAs se produce una vez en la vida y que luego se mantiene constante. Esta interpretación aportaría evidencia de que los machos apareados con hembras no vírgenes no invierten tiempo en cópula para reducir la receptividad a través de la transferencia de PGAs, y probablemente, maximicen su éxito reproductivo regulando la cantidad de espermatozoides transferido y compitiendo con el espermatozoides del macho que los precedió. En *C. capitata* se mostró que los machos tienen la capacidad de regular la cantidad de espermatozoides transferido en función de la presencia de otros machos alrededor, y así evitar, o al menos minimizar, la competencia espermática (Gage 1991), y se ha inferido que esto también sucede en función del tamaño de la hembra (Taylor *et al.* 2001b). Esto último fue demostrado en otros insectos (Gage 1998). Sería muy interesante analizar si la reducción en la duración de la segunda cópula involucra una disminución o no en la cantidad de espermatozoides transferido. Esta hipótesis presentada sobre la posible causa de la reducción de la duración de la segunda cópula con respecto a la primera asume asimismo que los machos son capaces de regular la duración de la cópula. La fuerte asociación entre la duración de la cópula y el origen del macho, no es por sí mismo una evidencia de un rol activo por parte del macho en la determinación del tiempo de cópula. Sin embargo, señala que el origen del macho está involucrado en la duración ya sea sin participación por parte de la hembra (una vez que el macho finaliza la transferencia de espermatozoides y PGAs, se separa de la hembra) o con cierta participación por parte de ella (el macho transfiere espermatozoides y/o PGAs y la cópula es finalizada por la hembra).

Consideraciones finales

El estudio del comportamiento post-copulatorio y la propensión a la recópula presentado en este capítulo mostró que el nivel y la cantidad de información que se obtiene al utilizar la marca individual sobre las moscas es superior al alcanzado en otro tipo de estudios. Este hecho permite obtener información muy detallada de distintos aspectos del comportamiento y han permitido, en este caso, esclarecer algunas tendencias y elaborar nuevas hipótesis sobre posibles mecanismos involucrados en este comportamiento. Las diferencias encontradas en la tasa de recópula en función del origen del macho en estudios previos se extienden, con los resultados presentados aquí, a hembras silvestres. El hecho de que en las hembras no se altere el patrón de elección de pareja luego de la primera cópula, compensa el efecto negativo, para la TIE, del origen del macho en la propensión a la recópula. La obtención de estos resultados fue posible gracias al uso de jaulas de campo simulando condiciones naturales. Si bien estos estudios son una aproximación más cercana a la realidad en el campo que los estudios de laboratorio, no dejan de ser una situación artificial. Sería de importancia práctica poder correlacionar los resultados encontrados con valores reales de la recópula en el campo. Esto apoyaría la decisión de incorporar un análisis del comportamiento de recópula en las pruebas de control de calidad que se realizan en forma rutinaria sobre los machos que se crían masivamente para la liberación a campo (IAEA 2001). Asimismo, permitiría obtener resultados para poder evaluar el verdadero impacto de la recópula en la TIE.

Si bien a través del mismo es posible determinar la presencia de algún nivel de incompatibilidad entre poblaciones, cualquiera sea el mecanismo actuante queda dentro de los procesos previos a la fertilización o pre-cigóticos. En el próximo capítulo se analizan distintos aspectos, a través de distintos enfoques, de la compatibilidad reproductiva post-cigótica, es decir, la que actúa luego de la fertilización y puede comprometer también el éxito reproductivo de los individuos.

6. Compatibilidad Post-cigótica

6.1 Introducción

Las etapas posteriores a la fecundación también son fundamentales para el éxito reproductivo de una especie, ya que de éstas dependerá el desarrollo de una descendencia viable y fértil. Una vez que las gametas entran en contacto, la interacción de los genomas paternos puede ocasionar la reducción en la viabilidad de la descendencia, o bien generar algún tipo de esterilidad en ésta o en las siguientes generaciones poniendo de manifiesto la ocurrencia de incompatibilidad post-cigótica.

Se conocen muchos casos, dentro de los insectos, de incompatibilidad post-cigótica entre especies y dentro de una misma especie entre poblaciones aisladas sometidas a diferentes fuerzas de selección. La ausencia de mecanismos de aislamiento pre-cigóticos entre especies cercanas, puede permitir el apareamiento entre los individuos, pero son los mecanismos de aislamiento post-cigóticos los que garantizan, en este caso, que las especies se mantengan aisladas (Dobzhansky, 1937). En el género *Drosophila* se detectó la ocurrencia de anomalías fenotípicas en las cruzas híbridas entre poblaciones altamente diferenciadas (Stutervant 1939). Posteriormente, en *Drosophila melanogaster*, se encontraron anomalías fenotípicas asociadas a cruzas híbridas entre poblaciones silvestres y líneas de laboratorio. Estas anomalías incluyen alta tasa de recombinación en machos, atrofia gonadal, aparición de mutaciones espontáneas y reordenamientos cromosómicos, entre otras, y ha sido denominado *disgenesia híbrida* (Sved 1976). Este fenómeno fue posteriormente informado en otras especies del género (Evgen'ev *et al* 1982, Lozovskaya *et al.* 1990, Scheinker *et al.* 1990), en dípteros de otras familias (Hägele 1987, Hägele y Oschmann 1987), y en *Ceratitis capitata* (Torti *et al.* 1994).

La disgenesia híbrida fue ampliamente estudiada en *D. melanogaster* (revisado en Kidwell 1982, McDonald 1995). La misma se presenta sólo en una de las dos cruzas recíprocas y algunas líneas, o poblaciones, la generan cuando en la craza involucra al

macho, mientras que otras lo hacen cuando involucra a la hembra. Esto llevó a la clasificación de las líneas en dos categorías P y M, por paterno y materno, en función del sexo involucrado en la cruce disgénica. Se observó, también, que la herencia materna debía comprender al citoplasma y se postuló la presencia de distintos citotipos (Engels 1979ab). Los machos de las líneas P se debían cruzar con el citotipo correcto, presente en las hembras M, para que se manifestara el fenómeno. Se postuló la presencia de elementos genéticos novedosos causantes de estas anomalías a los que se denominó elementos *P* (Bregliano y Kidwell 1983, Engels 1983). Paralelamente se describieron otros sistemas disgénicos, con características distintas al P-M, que se denominaron I-R y H-E (Kidwell 1979, Bucheton 1984, Blackman *et al.* 1987, Yannopoulos *et al.* 1987). Estudios posteriores mostraron que en todos estos sistemas había elementos genéticos móviles, o transposones, activos (Engels y Preston 1984, Yannopoulos *et al.* 1987).

Los elementos genéticos móviles, o transposones, son porciones de ADN errante dentro del genoma (Hatcher 2000). Son relativamente pequeños y se pueden insertar tanto en regiones no codificantes como en regiones codificantes. Poseen la característica de trasladarse de una porción a otra del genoma en forma aleatoria y contribuyen significativamente a la evolución del genoma así como a la organización del mismo. No sólo son responsables de grandes cantidades de ADN repetitivo en el genoma, sino que también son el ‘combustible’ para las mutaciones genómicas, para la expresión o silenciamiento de algún gen de importancia regulatoria, (como en el maíz el alelo wxG, generado por la inserción en un exón del locus waxy, que produce un incremento de 30 veces en la actividad enzimática del polen) y para las reorganizaciones (McDonald, 1995). Asimismo inducen reordenamientos cromosómicos tales como duplicaciones, deleciones, inversiones y translocaciones como producto de la recombinación ectópica entre secuencias homólogas tales como los LTR de los retrotransposones (Kidwell y Lisch 1997, 1998, 2001). Evolutivamente se postula que son elementos parásitos que colonizaron el ADN genómico y que lo utilizan para su perpetuación. Están ampliamente distribuidos en todos los organismos vegetales y animales, incluyendo insectos. En función de los grados de similitud que presenten, se los puede agrupar en subfamilias, familias y superfamilias semejando las jerarquías taxonómicas con que se

clasifican las especies. Todavía no se sabe como los transposones colonizaron sus huéspedes (Engels 1992), si bien, para el elemento P parece demostrado que la transmisión horizontal cumplió un rol importante en la colonización de *Drosophila melanogaster* (Houck *et al.* 1991, Kidwell 1993). Se propuso, incluso, que los elementos P habrían invadido el genoma de las poblaciones silvestres de *D. melanogaster* hace relativamente poco tiempo, y que las líneas que ya se encontraban aisladas en el laboratorio no sufrieron dicha invasión y por lo tanto están carentes de ellos, llegando a quedar en un estado que se podría llamar ancestral. El encuentro de estos dos grupos desencadenó el fenómeno de disgenesia.

Las manifestaciones del síndrome de disgenesia híbrida, así como el estudio de los mecanismos involucrados, tuvo consecuencias teóricas y prácticas. Desde el punto de vista de la biología evolutiva, se postuló que este fenómeno podría estar involucrado en el establecimiento de barreras reproductivas post-cigóticas y en algunos casos representar el inicio de un proceso de especiación (Kidwell y Novy 1979, Kidwell 1982). Los procesos de aislamiento de este tipo, mediados por elementos móviles, actuarían mucho más rápido que los procesos de diversificación genética en poblaciones geográficamente aisladas que resulten en cambios morfológicos y comportamentales capaces de producir aislamiento reproductivo (Bingham *et al.* 1982). Sin embargo esta hipótesis está aún bajo discusión ya que si bien es evidente que los transposones juegan un rol en la evolución de sus hospedadores, al promover mutaciones y cambios genéticos, y como consecuencia posiblemente, en el surgimiento y/o evolución de nuevas especies, no es tan evidente cuál es la importancia de dicha participación (Kidwell y Lisch 1998). Desde un punto de vista práctico, con el desarrollo de la ingeniería genética fue posible utilizar la propiedad saltarina de estos factores para introducir genes foráneos dentro de un genoma, técnica conocida como transgénesis o transformación genética. En insectos esto se ha logrado en distintos grupos y dentro del género *Drosophila* utilizando elementos P como vectores (Rubin y Spradling 1983).

Los excelentes resultados obtenidos en la creación de insectos transgénicos en *Drosophila* utilizando los elementos P, alentaron a los científicos a proponer el uso de estos elementos para realizar transformaciones en *C. Capitata* (IAEA 1985) y a buscar

evidencias de la presencia de transposones activos, como por ejemplo, a través de la ocurrencia del fenómeno de disgenesia híbrida. La obtención de líneas transgénicas podría contribuir al control de distintos insectos plaga (Louis *et al.* 1987) e incrementar el éxito de la TIE (IAEA 1994).

En 1994, Torti *et al.* encontraron la ocurrencia de un fenómeno similar al presente en *D. melanogaster* en los cruzamientos entre líneas de laboratorio de distinto origen geográfico e historias de colonización. La fenomenología observada permitió postular la presencia de elementos *P*, si bien el sistema operante parecía ser distinto, en algunos aspectos, al P-M presente en *Drosophila* (Torti *et al.* 1994). Asimismo, en el IGEAF, INTA-Castelar, se detectó que los individuos provenientes de la cruce entre machos de la línea Arg17 (línea de la que luego se derivó la Arg17y-80, Capítulo 3.4) y hembras de la familia 29795 (derivada de la línea Arg254, en la que los mutantes *singed* (individuos con pelos cuticulares con un aspecto chamuscado) aparecen espontáneamente), presentaron síntomas de atrofia gonadal asociados con una reducción en la viabilidad (Spinoglio *et al.* 1997).

Por otro lado, los intentos de transformación usando elementos *P*, no sólo en *C. capitata* sino también en otros dípteros, fueron fallidos y mostraron que este sistema no era efectivo fuera del género *Drosophila* (Robinson *et al.* 1988, O'Brotcha y Handler 1988, O'Brotcha y Atkinson 1996). Posteriormente, el uso de elementos móviles de la familia *Mariner* produjo buenos resultados (Plasterk *et al.* 1999). Se encontró que *C. capitata* poseía elementos móviles de dicha familia tanto en poblaciones silvestres como en líneas de laboratorio (Robertson y MacLeod 1993, Robertson y Lampe 1995, Torti *et al.* 2000). Finalmente, la transformación genética se logró primero con *Minos* (Loukeris *et al.* 1995), y más recientemente con *piggyBac* (Handler *et al.* 1998) y *Hermes* (Michel *et al.* 2001).

La ocurrencia del caso de disgenesia informado por Torti *et al.* (1994), más observaciones realizadas posteriormente por el mismo grupo de trabajo (Gasperi, com. pers.) y por otros investigadores (Rendón, com. pers. y Franz citado en Cayol 2000a, y también en el IGEAF, INTA Castelar), sugieren que la presencia del fenómeno de

disgenesia es frecuente en *C. capitata*. En algunos casos, se registró una fuerte reducción en la fecundidad de las hembras originadas de cruza entre individuos de distintas líneas. Algunas de estas observaciones fueron complementadas con disecciones de gónadas donde se observaron hembras con ovarios no desarrollados. El uso mundialmente extendido de la TIE, la necesidad de aumentar la producción de las biofábricas y de incorporar material genético silvestre, o de reciente introducción, en las líneas de cría masiva señalan, que la determinación de la compatibilidad entre poblaciones y líneas de *C. capitata*, no debe quedar en estudios que abarquen solamente los aspectos pre-cigóticos. Es necesario profundizar distintos aspectos de la compatibilidad post-cigótica, aún cuando la creación de líneas transgénicas, mediante la transformación, no sea la aplicación más próxima.

Con el objeto de detectar evidencias de incompatibilidad post-cigótica, se realizaron distintos cruzamientos que involucraron poblaciones silvestres y líneas de laboratorio de distintos orígenes geográficos e historias de colonización, poniendo especial interés en la búsqueda de manifestaciones del síndrome de disgenesia híbrida.

6.2 Compatibilidad post-cigótica entre Sáenz Peña y Reconquista

Material y Métodos

El experimento se realizó entre enero y marzo de 1998. Las parejas se obtuvieron de las pruebas de jaulas de campo para analizar la compatibilidad para el apareamiento entre las poblaciones de Sáenz Peña (SP) y Reconquista (Re) (Capítulo 4). Al día siguiente de concretada la cópula se colocó, en cada frasco, una fruta artificial de agar al 10% coloreado, y revestida con parafilm®. Se retiraron los huevos con ayuda de un bisturí y de agujas enmangadas 24-48 hs mas tarde, y se los sembró siguiendo la metodología estándar. En días subsiguientes se repitió este procedimiento. Los demás pasos hasta la obtención de la progenie y la preservación de las hembras para la disección de las gónadas siguieron la metodología presentada en Material y Métodos (Capítulo 3.6).

Resultados

En todos los casos, la viabilidad máxima presentó valores cercanos al 30% con una tendencia a mayores valores si las cruzas era heterotípicas (Tabla 6.1). El ANOVA no paramétrico no reveló diferencias atribuibles al tipo de craza ($H_{(3)} = 2.62$, $P = 0.454$). Para las cruzas heterotípicas se registró una tendencia hacia un mayor número de hembras por familia (Tabla 6.1). Sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre grupos ($H_{(3)} = 3.48$, $P = 0.324$). Tampoco se encontraron diferencias, en estas dos variables, cuando se agruparon los datos en cruzas homotípicas vs. heterotípicas (datos no mostrados).

Cruza	Viabilidad máxima	Proporción de machos
SP x SP	24.43 ± 18.03 (30)	0.49 ± 0.14 (11)
SP x Re	38.47 ± 19.11 (8)	0.40 ± 0.18 (4)
Re x SP	33.22 ± 31.02 (11)	0.40 ± 0.28 (2)
Re x Re	29.01 ± 21.49 (14)	0.63 ± 0.17 (3)

Tabla 6.1: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie para cada tipo de craza. Media ± desvío estándar (N).

Con respecto a la disección de gónadas, se detectaron sólo dos casos de hembras con ambos ovarios atrofiados provenientes de dos familias Re x SP (Tabla 6.2). Las hembras de las otras cruzas analizadas no presentaron atrofia gonadal. Con respecto a la F2, no se encontraron casos de esterilidad en los híbridos (datos no mostrados).

Origen hembra	NN	NA/AN	AA	Flias	%NN	%AA
SP x Re	50	0	0	20	100.00	0.00
Re x SP	37	0	2	17	94.87	4.13
Re x Re	15	0	0	3	100.00	0.00

Tabla 6.2: Desarrollo gonadal en hembras provenientes de cruzas entre SP y Re. NN: ambos ovarios normales, NA/AN: uno de los ovarios atrofiado y el otro normal, AA: ambos ovarios atrofiados, Flias: familias analizadas para cada craza.

Interpretación

En este estudio no se encontraron evidencias de reducción en la viabilidad de la progenie o distorsión de sexos asociadas a las cruzas híbridas, por el contrario, se observó un incremento de la viabilidad en estas cruzas. Sin embargo, este incremento no resultó ser estadísticamente significativo, por lo que es posible concluir que las poblaciones no divergieron lo suficiente como para que se establezcan barreras de

aislamiento post-cigóticas ni como para que surja vigor híbrido. Se observó una tendencia hacia la disminución en el número de machos emergidos en las cruzas híbridas. Nuevamente las diferencias no fueron estadísticamente significativas, sin embargo es posible que el análisis estadístico no haya logrado separar los grupos. Para esta variable el número de familias analizadas fue menor que para viabilidad, ya que para muchas familias el número de adultos emergidos fue menor a diez, y por lo tanto, no se utilizaron para estimar la proporción de machos (ver viabilidad y relación de sexos en la progenie, Capítulo 3.6, Material y Métodos), disminuyendo la potencia del análisis. Los dos únicos casos de hembras con ambos ovarios atrofiados se presentaron en dos familias híbridas. Estas anomalías tuvieron una baja frecuencia, 2% del total de familias analizadas, por lo que no se evidenciaron diferencias entre grupos. Estos resultados muestran que Sáenz Peña y Reconquista son poblaciones totalmente compatibles, al menos, bajo condiciones de laboratorio.

Un análisis a mayor escala debería involucrar más poblaciones que preferentemente estén geográficamente más lejanas o que pertenezcan a distintas regiones eco-climáticas. Sin embargo, con la metodología empleada dicho análisis se torna difícil de realizar debido a dos restricciones que limitan el número de poblaciones a analizar. Estas dos limitaciones son la dificultad que implica sincronizar la emergencia simultánea de varias poblaciones para poder realizar una amplia serie de cruzas y la baja aceptación por parte de las hembras silvestres a oviponer sobre fruta plástica. El segundo inconveniente aquí se salvó recolectando los huevos en las frutas de agar. El nivel de aceptación fue bueno lo que permitió obtener progenie de hembras silvestres en condiciones de laboratorio. Sin embargo, recuperar los huevos de la fruta de agar es una tarea que consume mucho tiempo y que expone a los huevos a una manipulación mayor que en el caso de fruta plástica. Esta pudo ser la causa de los bajos valores de viabilidad encontrados.

Una alternativa para salvar estos dos inconvenientes es la realización de cruzas utilizando hembras de líneas de laboratorio. En este caso no es necesario sincronizar muestreos en distintas regiones y/o manejar el ingreso de material infestado de distintas localidades al mismo tiempo. A medida que se obtiene material silvestre, se cruzan los

machos con hembras de una línea de laboratorio de referencia. De esta forma se generan dos tipos de cruzas: una homotípica (machos y hembras de laboratorio), y otra heterotípica (machos silvestres y hembras de laboratorio). La recolección de huevos en la fruta plástica no expone los huevos a un manipuleo excesivo y, al ser más rápida, permite en menos tiempo obtener huevos de un mayor número de hembras.

En la siguiente sección se muestran los resultados del estudio de compatibilidad post-cigótica entre machos de seis poblaciones silvestres de Argentina y hembras de una línea de laboratorio.

6.3 Compatibilidad post-cigótica entre machos de seis poblaciones silvestres de Argentina y hembras Arg17y-80

Material y Métodos

Las poblaciones silvestres utilizadas fueron: Concordia (**Con**), General Roca (**GR**), Perico (**Pe**), Reconquista (**Re**), Sáenz Peña (**SP**), y Santa Rosa (**SR**). La línea de laboratorio fue Arg17y-80 (Capítulo 3.4). GR y Pe fueron analizadas en abril y diciembre de 1997 respectivamente. SP y Re fueron analizadas en enero, Con en febrero y SR en mayo de 1998. Para GR y Pe se realizaron cruzas dirigidas. Para las otras poblaciones, se recuperaron las parejas formadas al analizar la compatibilidad para el apareamiento (Capítulo 4.2). Se realizaron cruzas Arg17y-80 x Arg17y-80 para garantizar la presencia de una craza homotípica en cada experimento. Esta última craza se realizó en todos los experimentos por lo que se evaluó la homogeneidad entre los mismos y se agruparon, para el análisis de datos, las familias de todos los experimentos que resultaron homogéneos. El estudio de la primera generación siguió la metodología presentada en Material y Métodos (Capítulo 3.6). Para analizar la fecundidad de las hembras híbridas y la fertilidad de los machos, se realizaron retrocruzas con Arg17y-80 tanto vía materna como vía paterna. Se contabilizó el número de huevos colectados en cada ocasión por lo que fue posible determinar la viabilidad en el desarrollo. Con el número de adultos emergidos se estimó la proporción de machos y la fecundidad de las

hembras. Una vez obtenida la descendencia, las madres fueron preservadas para determinar el grado de desarrollo gonadal y la presencia de ovarios atrofiados.

Resultados

La viabilidad máxima media fue superior al 50% para todos los tipos de cruzas con la excepción de Pe x Arg17y-80 (Tabla 6.3). Para este último experimento la viabilidad del control Arg17y-80 x Arg17y-80 también fue baja, y menor a la observada para esta craza en los otros experimentos ($P < 0.05$). El ANOVA no paramétrico mostró diferencias entre los distintos grupos de la craza homotípica ($H_{(4)} = 23.12$, $P = 0.0001$), y el test de comparaciones múltiples separó las familias control de este experimento de las de los otros experimentos. Por lo tanto, las cruzas Arg17y-80 x Arg17y-80, obtenidas cuando se analizó el material de Pe, fueron eliminadas del conjunto de familias de la craza control en el análisis global y la craza Pe x Arg17y-80 fue analizada por separado. Para las otras poblaciones, no se encontraron diferencias de viabilidad entre grupos ($H_{(5)} = 5.36$, $P = 0.374$), indicando que las cruzas híbridas son igualmente viables que la craza homotípica. La proporción de sexos se mantuvo cercana al 1:1 (50% de machos) en todas las cruzas (Tabla 6.3), sin encontrarse tampoco diferencias entre las mismas ($H_{(5)} = 2.70$, $P = 0.747$).

Cruza	Viabilidad máxima	Proporción de machos
GR x Arg17y-80	60.81 ± 27.69 (20)	0.52 ± 0.17 (13)
Pe x Arg17y-80	35.99 ± 17.45 (12)	0.58 ± 0.16 (7)
SP x Arg17y-80	62.11 ± 16.26 (29)	0.52 ± 0.08 (26)
Re x Arg17y-80	63.06 ± 21.46 (21)	0.47 ± 0.14 (19)
Con x Arg17y-80	64.70 ± 9.12 (12)	0.54 ± 0.12 (12)
SR x Arg17y-80	50.31 ± 25.60 (18)	0.49 ± 0.10 (13)
Arg17y-80 x Arg17y-80	64.06 ± 21.88 (92)	0.50 ± 0.09 (81)

Tabla 6.3: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie híbrida, para cada tipo de craza entre machos de distintas poblaciones silvestres y hembras de la línea Arg17y-80. Media ± desvío estándar (N).

Las cruzas Pe x Arg17y-80 mostraron un aumento significativo de la viabilidad respecto de las cruzas Arg17y-80 x Arg17y-80 (test de medianas de Mann-Whitney, $Z = -2.24$, $P = 0.025$, Media para Arg17y-80 x Arg17y-80 = 20.08 ± 11.32 , $N = 12$; Media para Pe x

17y-chico en Tabla 6.3). La proporción de machos no fue analizada debido al bajo número de familias con ese dato.

Con respecto a las retrocruzas, se observaron diferencias en los valores de viabilidad entre las distintas poblaciones (Tabla 6.4). Estas diferencias fueron observadas tanto en las retrocruzas vía materna ($H_{(5)} = 12.35$, $P = 0.030$) como en aquellas vía paterna ($H_{(5)} = 33.51$, $P < 0.0001$). Para las retrocruzas vía materna, GR presentó el menor valor de viabilidad y Con el mayor. El test de comparaciones múltiples de Dunn mostró que las diferencias entre Con y GR fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$). En cuanto a las retrocruzas vía paterna, el test de comparaciones múltiples mostró diferencias entre SP y las poblaciones GR y SR ($P < 0.001$ en ambos casos) y entre Con y GR ($P < 0.05$).

Población	Viabilidad máxima	
	Retrocruza materna	Retrocruza paterna
GR	51.59 ± 16.73 (8) a	89.17 ± 8.94 (10) a
Pe	60.27 ± 27.42 (5) ab	72.89 ± 11.78 (10) abc
SP	56.68 ± 19.55 (10) ab	45.01 ± 20.19 (17) c
Re	66.69 ± 25.56 (9) ab	54.61 ± 39.47 (3) abc
Con	85.81 ± 11.85 (7) b	63.95 ± 13.09 (9) bc
SR	61.99 ± 24.56 (15) ab	76.90 ± 17.27 (18) ab

Tabla 6.4: Viabilidad máxima de la progenie de las retrocruzas. Para cada población se indican las retrocruzas por vía materna y paterna. Media ± desvío estándar (N). Para cada columna los valores seguidos de una letra distinta difieren significativamente (Comparaciones múltiples de Dunn, $P < 0.05$).

La proporción de machos fue similar para ambos tipos de retrocruzas y los valores oscilaron alrededor de 0.5 (Tabla 6.5).

Población	Proporción de machos	
	Retrocruza materna	Retrocruza paterna
GR	0.50 ± 0.06 (10)	0,53 ± 0,04 (10)
Pe	0.49 ± 0.07 (15)	0,53 ± 0,04 (10)
SP	0.45 ± 0.09 (17)	0,52 ± 0,09 (18)
Re	0.51 ± 0.06 (21)	0,50 ± 0,06 (17)
Con	0.49 ± 0.10 (8)	0,48 ± 0,08 (8)
SR	0.48 ± 0.12 (14)	0,51 ± 0,04 (17)

Tabla 6.5: Proporción de machos de la progenie de las retrocruzas. Para cada población se indican las retrocruzas por vía materna y paterna. Media ± desvío estándar (N).

El test de Kruskal-Wallis confirmó la falta de diferencias entre grupos ($H_{(5)} = 5.14$, $P = 0.399$ y $H_{(5)} = 4.08$, $P = 0.537$ para las retrocruzas vía materna y paterna respectivamente).

La fecundidad de los híbridos también fue evaluada a través de retrocruzas tanto vía materna como paterna. La retrocruza vía materna reveló la fecundidad de las hembras híbridas y la retrocruza vía paterna la fecundidad de las hembras Arg17y-80 apareadas con machos híbridos. Los valores medios de hijos obtenidos por juntada fueron distintos entre los grupos (Tabla 6.6), y estas diferencias fueron significativas tanto para las retrocruzas que se hicieron vía materna ($H_{(4)} = 14.73$, $P = 0.005$) como vía paterna ($H_{(4)} = 33.52$, $P < 0.0001$). Las comparaciones múltiples de a pares permitieron detectar cuales fueron las poblaciones que difirieron entre sí (Tabla 6.6).

Población	Fecundidad	
	Retrocruza materna	Retrocruza paterna
GR	11.27 ± 4.87 (10) ab	14.43 ± 5.47 (10) abcd
SP	8.02 ± 7.28 (18) a	6.65 ± 6.38 (18) b
Re	17.01 ± 9.94 (22) b	27.76 ± 14.86 (16) c
Con	18.25 ± 12.73 (8) ab	7.96 ± 4.28 (8) ab
SR	10.00 ± 7.78 (16) ab	25.86 ± 11.75 (18) cd

Tabla 6.6: Fecundidad de la progenie híbrida, medida como el número de hijos obtenidos por hembra en una colecta de huevos. Media ± desvío estándar (N). Para cada columna los valores seguidos de una letra distinta difieren significativamente (Comparaciones múltiples de Dunn, $P < 0.05$).

Además de comparar la viabilidad y proporción de sexos de las retrocruzas y la fecundidad de las hembras híbridas entre las distintas poblaciones, se hicieron comparaciones, dentro de cada población, entre las retrocruzas vía paterna y las retrocruzas vía materna de cada familia a través del test de medianas de Wilcoxon para muestras pareadas. Con respecto a la viabilidad (Tabla 6.4), en las cruzas, originadas de GR, donde el híbrido provino vía materna presentaron viabilidades menores a las observadas en las cruzas donde el híbrido provino vía paterna ($P = 0.017$). Para SP y Con la tendencia fue opuesta, y las cruzas donde el híbrido provino vía materna presentaron viabilidades mayores a las observadas en las cruzas donde el híbrido provino vía paterna ($P = 0.043$ para SP y $P = 0.028$ para Con). La proporción de sexos (Tabla 6.5) mostró una tendencia a valores mayores si en la retrocruza el macho era

híbrido, pero las diferencias fueron no significativas. Con respecto a la fecundidad (Tabla 6.6), Re y SR presentaron mayores valores si el híbrido provino vía paterna en lugar de vía materna ($P = 0.049$ para Re y $P = 0.004$ para SR). Al agrupar todas las poblaciones la fecundidad mostró una fuerte tendencia ($P = 0.005$) a ser mayor en las retrocruzas vía paterna (17.67 ± 13.53 , $N = 70$) que vía materna (12.67 ± 9.38 , $N = 74$).

Las disecciones de gónadas, mostraron hembras con ambos ovarios atrofiados en algunas de las cruzas híbridas pero no en todas (Tabla 6.7). El porcentaje más alto de hembras con ambos ovarios atrofiados fue para la craza SR x Arg17y-80, seguido de Arg17y-80 x Arg17y-80. Cuando se compararon los valores registrados sumando las cruzas entre machos silvestres y hembras Arg17y-80 con las hembras obtenidas de las cruzas homotípicas entre individuos Arg17y-80, se observó que las hembras del laboratorio presentaron mayores valores que las hembras híbridas ($\chi^2_{(2)} = 22.10$, $P < 0.0001$). Cuando se comparó Arg17y-80 x Arg17y-80 con cada población por separado, se observaron diferencias significativas para el caso de Con ($\chi^2_{(1)} = 10.15$, $P = 0.001$) y de Re ($\chi^2_{(1)} = 5.96$, $P = 0.015$). En ambos casos las cruzas híbridas presentaron un número significativamente menor de hembras con ambos ovarios atrofiados. Disecciones realizadas en hijas de cruzas entre machos Arg17y-80 y hembras SP o Re, mostraron un sólo caso de atrofia gonadal completa entre 123 hembras analizadas provenientes de 15 familias.

Origen hembra	NN	NA/AN	AA	Flias	%NN	%AA
GR x Arg17y-80	65	2	1	3/10	92.86	1.43
Pe x Arg17y-80	55	0	0	0/20	100.00	0.00
SP x Arg17y-80	261	0	0	0/36	100.00	0.00
Re x Arg17y-80	151	0	1	1/22	99.34	0.66
Con x Arg17y-80	190	0	0	0/15	100.00	0.00
SR x Arg17y-80	56	1	6	5/16	87.50	9.38
Arg17y-80 x Arg17y-80	461	0	25	19/153	94.86	5.14
Arg17y-80 x SP	86	0	0	0/10	100.00	0.00
Arg17y-80 x Re	37	0	1	1/5	97.37	2.63

Tabla 6.7: Desarrollo gonadal en hembras provenientes de cruzas entre seis poblaciones silvestres y la línea Arg17y-80. NN: número de hembras con ambos ovarios normales, NA/AN: uno de los ovarios atrofiado y el otro normal, AA: ambos ovarios atrofiados, Flias: número de familias con al menos una hembra con un ovario atrofiado / familias analizadas en cada craza.

En las cruzas que involucraron machos de las poblaciones GR, SP, Con y SR se detectaron familias híbridas que presentaron anomalías en el desarrollo. Se pueden mencionar la baja viabilidad en la progenie híbrida, alta mortalidad de machos en la progenie híbrida seguida de alta mortalidad de machos en la retrocruza vía materna (Familia 38324, proveniente de SR), y distorsión de sexos en la progenie de las retrocruzas (varias familias en GR y Con). Estas familias son analizadas y discutidas con mayor detalle en la sección 6.8.

Interpretación

En la progenie híbrida no se detectaron diferencias de viabilidad ni de proporción de machos cuando se las comparó con la progenie de la craza homotípica, indicando buen nivel de compatibilidad reproductiva entre machos de las distintas poblaciones analizadas y hembras de la línea Arg17y-80. Sin embargo, la aparición de ciertas familias con anomalías en el desarrollo, pone de manifiesto la ocurrencia de heterogeneidad genética dentro de las poblaciones para atributos relacionados con la compatibilidad post-cigótica.

El estudio de las retrocruzas permitió comparar la fecundidad de las hembras híbridas en relación con las hembras Arg17y-80. La mayor fecundidad en hembras del laboratorio comparado con hembras híbridas muestra que los procesos de cría tienen un fuerte impacto en la fisiología de esta especie ya que seleccionan hembras más fecundas. La incorporación de genes silvestres a través del padre resultaron ocasionaron una disminución de estos niveles. Los mecanismos a través de los cuales esto sucedió no fueron analizados en este caso, pero se puede postular que probablemente estén relacionados con la maduración de huevos en las ovariolas o con el nivel de aceptación del sustrato de oviposición.

Con respecto al desarrollo de los ovarios, las hembras provenientes de las cruzas entre machos SR y hembras Arg17y-80 mostraron los mayores porcentajes de atrofia gonadal. Es interesante destacar que esta misma población presentó familias anormales con distorsión de sexos y una familia extrema (38324) con viabilidad del 50% y mortalidad, prácticamente total, de machos en la primera generación y en la progenie de la

retrocruza originada a partir de las hembras híbridas. Asimismo, los valores de viabilidad de SR fueron los más bajos registrados (sin considerar el caso excepcional de Pe), si bien las diferencias fueron estadísticamente no significativas. Estos resultados indican que en los machos de la población SR existen factores genéticos que producen distintos tipos de anomalías cuando se los cruza con hembras Arg17y-80.

Por otra parte, si bien GR no presentó un elevado número de hembras con atrofia gonadal, las mismas aparecieron en 3 de 10 familias analizadas, sugiriendo que es relativamente frecuente encontrar machos en dicha población capaces de generar este fenómeno.

La ocurrencia de familias anormales mostró que el diseño experimental utilizado resulta efectivo para detectar anomalías genéticas en machos de poblaciones silvestres. Asimismo, al usar hembras de una línea de laboratorio se aumentó el número de poblaciones analizadas así como el número de familias en cada población. Sin embargo, los valores de viabilidad de Arg17y-80 resultaron bajos en comparación con otras líneas de laboratorio criadas en las mismas condiciones. La alta homogeneidad encontrada en el análisis cromosómico de Arg17y-80 (Delprat 1999), estaría indicando un bajo grado de variabilidad genética, posiblemente debido a un exceso de endocría. Esta podría ser la causa de la disminución de la viabilidad y del alto número de hembras con ovarios atrofiados registradas (si se lo compara con los valores obtenidos para las hembras híbridas sin incluir el caso especial de SR). La elección de Arg17y-80 como línea de referencia, podría incluso haber ocultado ciertos casos de familias anormales que cayeron dentro de los intervalos observados para las cruzas homotípicas y, por lo tanto, fueron considerados normales. Esto llevó a continuar con este tipo de búsqueda de individuos con anomalías y evidencias de incompatibilidad post-cigótica cambiando la línea de referencia.

6.4 Compatibilidad post-cigótica entre machos de distintas poblaciones silvestres de Entre Ríos y Santa Fé y hembras Taf-99

Material y Métodos

La línea de laboratorio utilizada fue Taf-99 y las localidades de donde se tomaron las poblaciones silvestres fueron: Arocena (Aro), Concordia (Con), Monje (Mon), Puerto Yeruá (PY), Villa Zorraquín (VZ), y Yuquerí (Yuq). En algunas de ellas se colectó material en más de un sitio y en algunos casos, a su vez, se tomaron dos hospederos por sitio lo que resultó en un total de trece entradas diferentes (Tabla 3.2, Capítulo 3.4). Se realizaron cruzas dirigidas en el laboratorio sin elección de pareja. La única modificación de la metodología estándar (Capítulo 3.6) consistió en contar los huevos el mismo día de la colecta en vez de registrar eclosión de los mismos cinco días después. Con este procedimiento se obtuvo un valor de viabilidad conjunta para el desarrollo embrionario y larvario. El estudio de la siguiente generación se realizó cruzando entre sí, cinco machos y cinco hembras de cada familia. Se contabilizó el número de huevos colectados en cada ocasión por lo que fue posible determinar la viabilidad en el desarrollo. El análisis de datos se realizó tanto para las trece entradas por separado como agrupando los sitios y hospederos para cada localidad.

Resultados

La línea de laboratorio mostró un buen desempeño y los valores medios de viabilidad máxima fueron, en todos los casos, superiores al 60% (Tabla 6.8). El ANOVA no paramétrico no reveló diferencias en los valores de viabilidad entre cruzas ($H_{(13)} = 17.46$, $P = 0.179$). La proporción de sexos se mantuvo cercana a una relación 1:1 en todas las cruzas (Tabla 6.8). Tampoco se encontraron diferencias entre cruzas ($H_{(13)} = 21.52$, $P = 0.063$) al analizar todas las poblaciones por separado. Sin embargo, se observó una tendencia hacia un déficit de hembras en la craza homotípica, mientras que esto no sucedió en algunas cruzas híbridas. Sumando las poblaciones de la misma localidad se observó que había diferencias entre los grupos ($H_{(7)} = 17.29$, $P = 0.016$) para esta variable. En particular las cruzas que involucraron machos Taf-99 presentaron un valor

de proporción de machos mayor que las cruzas que involucraron machos de la zona sur de la ciudad de Concordia (0.49 ± 0.11 , para ConSD y ConSN) y de la localidad de Villa Zorraquín (0.49 ± 0.11 , para VZ1-3N y VZG) (Comparaciones múltiples de Dunn, $P < 0.05$). Cuando se agruparon todas las cruzas híbridas (proporción de machos = 0.50 ± 0.08 , $N = 162$) también se observaron diferencias significativas entre este grupo y la craza homotípica ($H_{(1)} = 12.26$, $P = 0.001$). Por otra parte, como se analizaron muchas poblaciones en un mismo momento, fue posible investigar el efecto del origen del macho en la postura de huevos de la hembra progenitora. Todas las hembras fueron expuestas a fruta plástica el mismo número de veces por lo que se consideró al número total de huevos puestos como una medida de la fecundidad de la hembra progenitora (Tabla 6.8). El valor medio de todos los grupos fue de 65 huevos por hembra y este valor no difirió entre grupos ($H_{(11)} = 5.32$, $P = 0.915$).

Origen macho	Viabilidad máxima	Proporción machos	Fecundidad
AroN	66.55 ± 25.92 (23)	0.52 ± 0.11 (19)	60.79 ± 48.06 (24)
ConND	67.48 ± 12.87 (6)	0.50 ± 0.09 (6)	54.00 ± 24.89 (6)
ConNG	78.55 ± 23.41 (32)	0.51 ± 0.06 (29)	-
ConSD	71.66 ± 24.01 (17)	0.48 ± 0.08 (14)	58.00 ± 30.56 (17)
ConSN	79.42 ± 15.40 (13)	0.50 ± 0.13 (13)	65.15 ± 42.56 (13)
MonP	60.83 ± 28.46 (13)	0.48 ± 0.10 (11)	71.38 ± 37.20 (13)
PYD	60.35 ± 23.32 (7)	0.49 ± 0.07 (4)	69.43 ± 53.49 (7)
PYM	78.20 ± 15.57 (8)	0.50 ± 0.06 (7)	92.88 ± 44.74 (8)
VZ1G	76.82 ± 22.72 (28)	0.47 ± 0.07 (24)	-
VZ1N	74.09 ± 3.00 (4)	0.52 ± 0.16 (4)	57.50 ± 32.25 (4)
VZ2N	76.37 ± 12.11 (11)	0.53 ± 0.06 (9)	72.18 ± 43.90 (11)
VZ3N	69.37 ± 25.46 (11)	0.48 ± 0.05 (9)	66.09 ± 44.34 (11)
YuqD	71.68 ± 25.66 (11)	0.48 ± 0.08 (11)	59.08 ± 35.54 (13)
Taf-99	76.84 ± 18.89 (69)	0.54 ± 0.08 (64)	63.25 ± 49.44 (24)

Tabla 6.8: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie híbrida, y fecundidad de las hembras progenitoras para cada tipo de craza entre machos de distintas poblaciones silvestres y hembras Taf-99. Media \pm desvío estándar (N).

Con respecto a la viabilidad de la segunda generación híbrida, los valores medios oscilaron dentro de los mismos valores que para la primera generación (Tabla 6.9). En este caso tampoco se detectaron diferencias entre grupos ($H_{(11)} = 4.23$, $P = 0.963$). La proporción de machos en la segunda generación mostró un leve aumento respecto de la primera en la mayoría de los casos (Tabla 6.9). El valor medio global para la primera

generación fue de 0.50 ± 0.09 , mientras que para la segunda generación fue de 0.53 ± 0.06 para las 117 familias que dieron progenie en ambas generaciones. Estos valores difirieron significativamente (test de t para muestras pareadas, $t = -2.85$, $gl = 116$, $P = 0.005$). Al analizar cada entrada por separado se observó que sólo en ConSD las diferencias se mantuvieron estadísticamente significativas ($t = -2.78$, $gl = 12$, $P = 0.017$). Al igual que para la primera generación, no se detectaron diferencias entre grupos para esta variable ($H_{(1)} = 7.76$, $P = 0.735$). Los valores de fecundidad de las hembras híbridas se muestra en la Tabla 6.9. Tampoco en este caso se detectaron diferencias entre grupos ($H_{(1)} = 10.70$, $P = 0.469$).

Origen macho	Viabilidad máxima	Proporción machos	Fecundidad
AroN	70.30 ± 11.86 (21)	0.51 ± 0.09 (20)	7.80 ± 4.25 (21)
ConND	69.98 ± 14.41 (6)	0.53 ± 0.04 (5)	4.41 ± 1.90 (6)
ConSD	66.30 ± 20.81 (16)	0.53 ± 0.05 (15)	6.90 ± 5.20 (16)
ConSN	67.08 ± 19.29 (13)	0.52 ± 0.05 (11)	7.27 ± 5.06 (13)
MonP	67.14 ± 18.43 (12)	0.53 ± 0.06 (11)	17.23 ± 6.50 (10)
PYD	63.88 ± 21.69 (6)	0.52 ± 0.04 (6)	5.45 ± 3.88 (6)
PYM	67.12 ± 13.46 (9)	0.56 ± 0.07 (9)	7.45 ± 2.56 (9)
VZ1N	74.28 ± 7.55 (3)	0.57 ± 0.05 (3)	6.60 ± 4.87 (3)
VZ2N	75.99 ± 12.77 (11)	0.53 ± 0.07 (11)	9.63 ± 6.39 (11)
VZ3N	67.35 ± 16.52 (9)	0.53 ± 0.03 (8)	12.46 ± 7.65 (9)
YuqD	71.80 ± 10.67 (14)	0.53 ± 0.06 (14)	8.75 ± 5.52 (14)
Taf-99	71.16 ± 14.66 (20)	0.55 ± 0.07 (27)	9.22 ± 7.00 (28)

Tabla 6.9: Viabilidad máxima y proporción de machos de la segunda generación, y fecundidad de la progenie para cada tipo de cruce entre distintas poblaciones silvestres y la línea Taf-99. Media \pm desvío estándar (N).

Con respecto a la disección de gónadas, se detectaron hembras con ambos ovarios atrofiados en algunas de las poblaciones pero no en todas (Tabla 6.10). El porcentaje más alto de hembras con ambos ovarios atrofiados fue para la cruce ConSN x Taf-99, seguido de VZ3N x Taf-99 y Taf-99 x Taf-99. Cuando se compararon los valores registrados sumando las cruces entre machos silvestres y hembras Taf-99 con las hembras obtenidas de las cruces homotípicas entre individuos Taf-99, no se encontraron diferencias entre ambos grupos ($\chi^2_{(2)} = 4.27$, $P = 0.118$). Sin embargo, cuando se hicieron las comparaciones individuales se observó que Taf-99 presentó más individuos con ambos ovarios atrofiados que MonP ($\chi^2_{(1)} = 10.98$, $P = 0.004$) y que YuqD ($\chi^2_{(1)} = 8.43$, $P = 0.015$). Cuando se evaluó el número de familias con hembras con al menos un

ovario atrofiado mediante un test excto de Fisher, se observó que Taf-99 presentó un mayor número de familias que las cruzas que involucraron machos MonP ($P = 0.025$). Para las otras cruzas las diferencias no fueron significativas.

Origen hembra	NN	NA/AN	AA	Flias	%NN	%AA
AroN	104	6	3	7/26	92.04	2.65
ConND	28	2	0	1/7	93.33	0.00
ConSD	74	6	4	8/19	88.10	4.76
ConSN	46	5	7	5/14	79.31	12.07
MonP	57	0	0	0/13	100.00	0.00
PYD	1	1	1	1/1	-	-
PYM	62	5	6	7/16	84.93	8.22
VZ1N	18	1	0	1/4	94.74	0.00
VZ2N	39	5	4	5/12	81.25	8.33
VZ3N	40	4	5	7/11	81.63	10.20
YuqD	62	2	0	2/15	96.88	0.00
Taf-99	82	7	10	10/24	82.83	10.10

Tabla 6.10: Desarrollo gonadal en hembras híbridas provenientes de cruzas entre machos de distintas poblaciones silvestres y hembras Taf-99. NN: número de hembras con ambos ovarios normales, NA/AN: uno de los ovarios atrofiado y el otro normal, AA: ambos ovarios atrofiados, Flias: número de familias con al menos una hembra con un ovario atrofiado / familias analizadas en cada cruza.

En las cruzas realizadas se detectaron familias híbridas que presentaron baja viabilidad en el desarrollo con distorsión de sexos (ConSN) y sin distorsión de sexos (PYD, AroN, MonP, VZ3N, ConNG, VZ1G) y baja viabilidad en la progenie de la segunda generación (ConNG). Dentro de estas familias, la 42525 es analizada y discutida con mayor detalle en la sección 6.8.

Interpretación

Al igual que en la sección anterior, se obtuvo progenie de las cruzas heterotípicas y dicha progenie no presentó diferencias de viabilidad ni de proporción de machos cuando se las comparó con la progenie homotípica. Es posible entonces concluir que el material genético aportado por los machos de las poblaciones analizadas es compatible con el aportado por las hembras de la línea Taf-99. Si bien a nivel grupal no se detectaron diferencias entre los distintos orígenes y el control, se registraron familias con problemas tanto en la viabilidad como en la proporción de machos.

En la primera generación las cruzas híbridas exhibieron una proporción de machos equivalente a la de hembras (0.5), mientras que la craza control mostró una tendencia a un déficit de hembras. Las diferencias resultaron significativas al agrupar a todas las cruzas híbridas en una sola categoría y en particular para las cruzas que involucraron machos de la zona sur de la ciudad de Concordia y de la localidad de Villa Zorraquín. En la segunda generación las diferencias en la proporción de machos entre las cruzas híbridas y Taf-99 fueron menos evidentes. Se observó un déficit de hembras en las cruzas híbridas. Este hecho podría ser explicado a través de la presencia de dos alelos distintos, uno de ellos dominante y presente en homocigosis en los individuos silvestres y que se manifiesta en una proporción de machos de 0.5. El otro alelo sería recesivo y estaría presente, también en homocigosis, en las hembras Taf-99 y produciría una proporción de sexos mayor a 0.5 (por caso 0.55). En la primera generación los individuos heterocigotas deberían presentar una proporción de machos igual a 0.5, como se observó en las cruzas heterotípicas. En la segunda generación la presencia de individuos homocigotas recesivos debería incrementar este valor, esto también se observó. Para poder confirmar esta hipótesis sería necesario contar con los valores de proporción de sexos de las poblaciones silvestres.

Con respecto al desarrollo gonadal, no se registró ninguna craza híbrida con un porcentaje de hembras disgénicas significativamente mayor a las hembras Taf-99. Dos orígenes presentaron un porcentaje significativamente menor, indicando que, al menos en estos casos, la incorporación de material genético silvestre mejoró el desarrollo gonadal. Por otro lado, hay que destacar que ConSN presentó un mayor número de familias con hembras con al menos un ovario atrofiado, sugiriendo que dentro de esta población, al igual que en GR y SR (Sección 6.3), es posible encontrar, con bastante frecuencia, machos capaces de generar este fenómeno.

El cambio de línea de laboratorio (Taf-99 en vez de Arg17y-80), resultó en mayores valores de viabilidad en las cruzas homotípicas y esto permitió detectar anomalías de menor magnitud. Sin embargo, al igual que en la otra sección, en este caso sólo se pudo analizar la compatibilidad entre distintas poblaciones y una línea de laboratorio. Con el diseño utilizado, no fue posible analizar la compatibilidad de las poblaciones entre sí.

Para poder continuar con la búsqueda de anomalías se consideró necesario buscar una alternativa que permitiese cruzar individuos de varias poblaciones entre sí. Teniendo en cuenta la ventaja de utilizar hembras adaptadas al laboratorio, desde el punto de vista de la practicidad en la recolección de huevos, se consideró la posibilidad de introducir a la cría de laboratorio distintas poblaciones del país y analizarlas sin dejar pasar muchas generaciones para evitar la endocria y pérdida de variabilidad genética. En las próximas secciones se muestran los resultados obtenidos luego de colonizar, adaptar al sustrato de oviposición, y cruzar ocho líneas de laboratorio entre sí. Se incluyó, además, una línea con muchas generaciones bajo cría artificial.

6.5 Compatibilidad post-cigótica entre distintas líneas analizada a través de una sola de las cruzas híbridas

Material y Métodos

En esta sección se estudiaron seis líneas: cuatro de Argentina, provenientes de Chilecito (**Chi-99**), Sáenz Peña (**SP-98**), Santa Rosa (**SR-98**), y Taficillo (**Taf-99**); y dos de Guatemala (**Gua-98** y **Pet-84**). Algunas de estas líneas provinieron de las mismas poblaciones que se analizaron en secciones anteriores (Tablas 2.1 y 2.2, Capítulo 3.4). El estudio se realizó entre julio y diciembre de 1999. Se realizaron cruzas dirigidas en el laboratorio con elección de pareja. Se obtuvo la progenie y se evaluó la viabilidad durante el desarrollo y la proporción de individuos de cada sexo. El estudio de la segunda generación se realizó cruzando entre sí, cinco machos y cinco hembras de cada familia. Una vez obtenida la descendencia, las hembras de la F1 fueron preservadas en alcohol 70% para determinar la presencia de ovarios atrofiados. El análisis de datos se realizó comparando, para cada variable, los valores obtenidos para las cruzas heterotípicas con los obtenidos en las cruzas homotípicas correspondientes a ambos padres.

Resultados

Los valores medios de viabilidad máxima de las cruzas heterotípicas fueron similares a los obtenidos para las cruzas homotípicas (Tabla 6.11). Las comparaciones entre las dos cruzas homotípicas y la craza heterotípica, en cada combinación de líneas, mostró que no existen diferencias en la viabilidad (en todos los casos $P > 0.05$). Los valores de proporción de machos más altos se registraron en las cruzas heterotípicas Gua-98 x SP-98 y Taf-99 x Gua-98 (Tabla 6.11). En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cruzas heterotípicas y las homotípicas.

Tipo de craza	Cruza	Viabilidad Máxima	Proporción machos
Heterotípica	Chi-99 x Gua-98	66.88 ± 14.90 (13)	0.55 ± 0.08 (13)
	Chi-99 x Pet-84	56.98 ± 26.17 (10)	0.54 ± 0.14 (10)
	Gua-98 x SP-98	72.43 ± 21.66 (3)	0.65 ± 0.17 (3)
	Pet-84 x Gua-98	75.10 ± 22.76 (16)	0.53 ± 0.13 (14)
	SP-98 x Chi-99	77.60 ± 10.29 (7)	0.52 ± 0.14 (7)
	SP-98 x SR-98	77.43 ± 12.27 (12)	0.49 ± 0.11 (11)
	SR-98 x Chi-99	69.38 ± 17.32 (12)	0.53 ± 0.13 (12)
	SR-98 x Gua-98	82.48 ± 10.94 (12)	0.49 ± 0.10 (12)
	SR-98 x Taf-99	66.65 ± 20.51 (6)	0.55 ± 0.08 (6)
	Taf-99 x Gua-98	69.71 ± 18.84 (18)	0.58 ± 0.13 (18)
Homotípica	Chi-99	64.18 ± 21.82 (9)	0.55 ± 0.11 (9)
	Gua-98	77.83 ± 15.19 (28)	0.54 ± 0.12 (26)
	Pet-84	69.31 ± 16.21 (20)	0.47 ± 0.09 (19)
	SP-98	70.90 ± 14.79 (9)	0.49 ± 0.11 (9)
	SR-98	72.61 ± 19.37 (39)	0.52 ± 0.07 (38)
	Taf-99	76.84 ± 18.89 (69)	0.54 ± 0.08 (64)

Tabla 6.11: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progeme híbrida para cada tipo de craza entre distintas líneas. Media ± desvío estándar (N).

La proporción de machos de la segunda generación híbrida se mantuvo dentro de los mismos valores que en la primera generación (Tabla 6.12). En este caso, tampoco se detectaron diferencias entre las cruzas homotípicas y las cruzas heterotípicas cuando se realizaron las comparaciones para cada combinación de líneas. El valor medio global para la primera generación fue de 0.53 ± 0.10 , mientras que para la segunda generación fue de 0.53 ± 0.08 para las 293 familias que dieron progeme en ambas generaciones. Estos valores no difirieron significativamente (test de t para muestras pareadas, $P > 0.05$). Tampoco lo hicieron los valores medios de las cruzas homotípicas y las heterotípicas al ser evaluadas por separado. Solamente para las familias Pet-84 x Pet-84

se observó un aumento significativo de la proporción de machos entre la primera y la segunda generación ($t = -2.59$, $gl = 14$, $P = 0.021$). Al igual que para la primera generación, no se detectaron diferencias entre grupos.

Los valores más elevados de fecundidad de las hembras en la primera generación se registraron para las cruzas SR-98 x SR-98 y SP-98 x SR-98 (Tabla 6.12). En este caso se detectaron diferencias entre las líneas SR-98 y Gua-98 y las líneas SR-98 y Taf-99 (Figura 6.1). En el primer caso, se observó que las cruzas Gua-98 x Gua-98 presentó una menor fecundidad que las hembras derivadas de SR-98 x SR-98 (Comparaciones múltiples de Dunn, $P < 0.005$) y la craza híbrida presentó valores intermedios. En el segundo caso, ambas cruzas homotípicas presentaron los valores extremos y difirieron significativamente ($P < 0.05$). La craza híbrida mostró valores cercanos a los observados en Taf-99 x Taf-99. Sin embargo, no se diferenció de ninguna de las dos cruzas homotípicas, posiblemente debido al bajo número de familias analizadas.

Tipo de craza	Cruza	Proporción machos	Fecundidad
Heterotípica	Chi-99 x Gua-98	0.55 ± 0.04 (11)	10.83 ± 6.40 (13)
	Chi-99 x Pet-84	0.52 ± 0.06 (9)	8.05 ± 3.69 (9)
	Gua-98 x SP-98	0.54 ± 0.09 (3)	10.05 ± 1.13 (3)
	Pet-84 x Gua-98	0.55 ± 0.10 (16)	10.15 ± 6.22 (17)
	SP-98 x Chi-99	0.53 ± 0.08 (7)	13.03 ± 5.86 (7)
	SP-98 x SR-98	0.51 ± 0.08 (12)	14.11 ± 7.71 (12)
	SR-98 x Chi-99	0.56 ± 0.05 (11)	12.32 ± 6.35 (11)
	SR-98 x Gua-98	0.51 ± 0.10 (12)	10.58 ± 7.20 (13)
	SR-98 x Taf-99	0.55 ± 0.10 (5)	7.83 ± 4.63 (6)
	Taf-99 x Gua-98	0.55 ± 0.07 (17)	8.76 ± 4.78 (17)
Homotípica	Chi-99	0.53 ± 0.07 (7)	7.84 ± 7.96 (8)
	Gua-98	0.53 ± 0.09 (21)	8.56 ± 5.36 (22)
	Pet-84	0.53 ± 0.06 (16)	10.88 ± 8.05 (16)
	SP-98	0.50 ± 0.06 (8)	11.28 ± 5.20 (8)
	SR-98	0.52 ± 0.05 (21)	15.97 ± 10.05 (22)
	Taf-99	0.55 ± 0.07 (27)	9.22 ± 7.00 (28)

Tabla 6.12: Proporción de machos de la segunda generación y fecundidad de las hembras de la primera generación. Media ± desvío estándar (N).

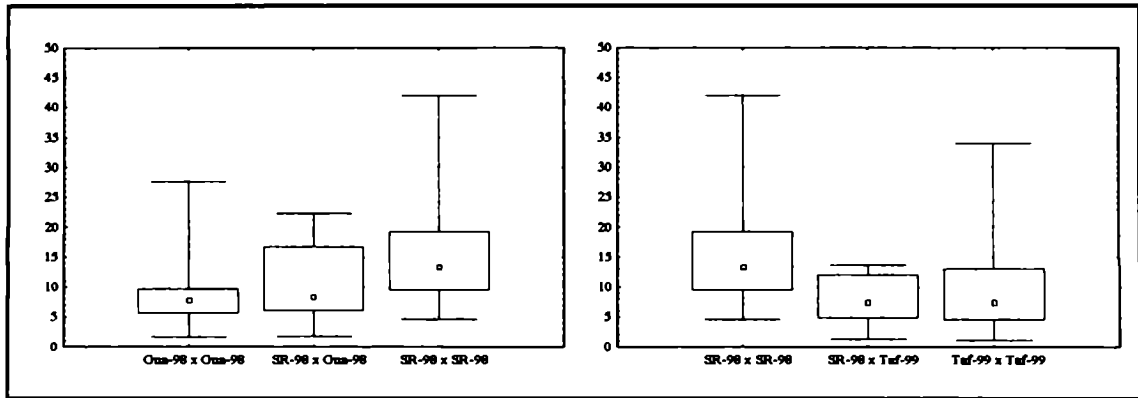


Figura 6.1: Valores de fecundidad para las hembras híbridas de la primera generación. Mediana, 1er y 3er cuartiles, máximo y mínimo. Distintas letras indican distintos valores ($P < 0.05$).

Con respecto a la disección de gónadas (Tabla 6.13), se detectaron hembras con ambos ovarios atrofiados en todas las cruza heterotípicas y en todas las homotípicas salvo Chi-99 x Chi-99. El porcentaje más alto de hembras con ambos ovarios atrofiados fue para la cruza SP-98 x Chi-98. Cuando se compararon los valores registrados para cada cruza heterotípica y las dos cruza homotípicas correspondientes, se observaron diferencias entre las siguientes combinaciones de líneas: Pet-84 y Gua-98 ($\chi^2_{(4)} = 11.25$, $P = 0.024$), SR-98 y Gua-98 ($\chi^2_{(4)} = 12.14$, $P = 0.016$), SR-98 y Taf-99 ($\chi^2_{(4)} = 25.11$, $P = 0.0001$), Chi-99 y Pet-84 ($\chi^2_{(4)} = 9.56$, $P = 0.048$), y entre SP-98 y Chi-99 ($\chi^2_{(4)} = 24.03$, $P = 0.001$). En Pet-84 x Gua-98 el híbrido presentó un menor número de hembras con ovarios atrofiados y, se diferenció de Gua-98 ($\chi^2_{(2)} = 9.73$, $P = 0.008$) y marginalmente de Pet-84 ($\chi^2_{(2)} = 5.86$, $P = 0.053$). En SR-98 x Gua-98, y SR-98 x Taf-99 las diferencias estuvieron generadas entre las dos líneas de laboratorio y el híbrido presentó un valor intermedio a ambas. En Chi-99 x Pet-84 el híbrido presentó un valor semejante a Pet-84 ($\chi^2_{(2)} = 2.39$, $P = 0.303$), y se diferenció de Chi-99 ($\chi^2_{(2)} = 9.08$, $P = 0.011$). En SP-98 x Chi-99 se registró un alto número de hembras híbridas con ambos ovarios atrofiados mientras que en las dos líneas que las originaron se registró un sólo caso (Tabla 6.13). Esto generó diferencias entre la cruza híbrida y SP-98 ($\chi^2_{(2)} = 14.22$, $P = 0.001$) y entre esta y Chi-99 ($\chi^2_{(2)} = 12.00$, $P = 0.002$). La cruza Gua-98 x SP-98 no fue analizada para esta variable ya que se contó sólo con dos hembras provenientes de una sola familia.

Tipo de cruce	Origen de la hembra	NN	NA/AN	AA	Flias	%NN	%AA
Heterotípica	Chi-99 x Gua-98	55	4	6	7/13	84.62	9.23
	Chi-99 x Pet-84	33	6	5	5/11	75.00	11.36
	Pet-84 x Gua-98	74	2	1	2/18	96.10	1.30
	SP-98 x Chi-99	28	6	7	6/9	68.29	17.07
	SP-98 x SR-98	51	2	1	3/12	94.44	1.85
	SR-98 x Chi-99	42	2	5	6/12	85.71	10.20
	SR-98 x Gua-98	44	2	3	4/12	89.80	6.12
	SR-98 x Taf-99	23	2	2	3/7	85.19	7.41
	Taf-99 x Gua-98	68	5	8	9/18	83.95	9.88
Homotípica	Chi-99	31	0	0	0/8	100.00	0.00
	Gua-98	77	12	7	10/21	80.21	7.29
	Pet-84	69	5	7	7/17	85.19	8.64
	SP-98	45	0	1	1/10	97.83	2.17
	SR-98	97	2	3	4/23	95.10	2.94
	Taf-99	30	7	5	6/9	71.43	11.90

Tabla 6.13: Desarrollo gonadal en hembras provenientes de cruces de distintas líneas de laboratorio cruzadas entre sí. NN: número de hembras con ambos ovarios normales, NA/AN: uno de los ovarios atrofiado y el otro normal, AA: ambos ovarios atrofiados, Flias: número de familias con al menos una hembra con un ovario atrofiado / familias analizadas en cada cruce.

En las cruces realizadas se detectaron familias híbridas con baja viabilidad, distorsión de sexos en la prole de las primera y segunda generaciones. Algunas de dichas familias son analizadas y discutidas con mayor detalle en la sección 6.8.

Interpretación

Ninguna de las cruces híbridas presentó valores de viabilidad de la primera generación significativamente menores a las dos líneas que las originaron, si bien se observaron casos con una tendencia hacia una menor viabilidad como por ejemplo en Chi-99 x Pet-84 y Taf-99 x Gua-98. En las cruces SP-98 x Chi-99, SP-98 x SR-98 y SR-98 x Gua-98 se observó lo opuesto, las cruces híbridas presentaron una tendencia hacia un aumento de la viabilidad. La falta de diferencias estadísticamente significativas, sumado a la falta de diferencias en la proporción de sexos de la primera y segunda generación, permiten concluir que las líneas mostraron niveles altos de compatibilidad. Sin embargo, es importante destacar que se encontraron familias híbridas con anomalías.

Con respecto a las disecciones de las gónadas la situación fue diferente. Se detectaron diferencias entre las cruces híbridas y las líneas que las originaron y además estas

últimas presentaron un comportamiento muy variado. Pet-84, Gua-98 y Taf-99 mostraron altos niveles de atrofia gonadal aún en cruzas homotípicas, mientras que en Chi-99 no se detectaron hembras con uno o ambos ovarios atrofiados. Cuando se realizaron las cruzas Pet-84 x Gua-98 y SP-98 x Chi-99 se observó en los híbridos un comportamiento distinto al de las líneas que los originaron. En el primer caso el híbrido presentó una disminución en el número de hembras con ovarios atrofiados y en el segundo se observó un aumento. Este último caso se asemeja al fenómeno de disgenesia híbrida descrito en *Drosophila melanogaster* (revisado en Kidwell 1982) e informado para ciertas cruzas en *Ceratitis capitata* (Torti *et al.* 1994, Spinoglio *et al.* 1997).

Si bien, no se encontraron diferencias entre las cruzas híbridas, y las líneas que las originaron, para viabilidad y proporción de individuos de cada sexo, tanto para la primera como la segunda generación, las evidencias se basaron en una sola de las dos cruzas híbridas. Es conocido que muchos casos de incompatibilidad se manifiestan solo en una de las dos cruzas híbridas, por lo que es necesario estudiar las dos cruzas recíprocas antes de concluir la ausencia total de incompatibilidad. En la siguiente sección se presentan los resultados de dicho estudio. Se emplearon algunas de las líneas analizadas aquí y otras de orígenes diferentes.

6.6 Compatibilidad post-cigótica entre distintas líneas analizada a través de las dos cruzas híbridas

Material y Métodos

En esta parte del estudio se analizaron cinco líneas: Santa Rosa (SR-98), Taficillo (Taf-99), Villa Zorraquín (VZ-99) e Ybyraty (Yby-99) de Argentina y Pet-84 de Guatemala (Tabla 3.1, Capítulo 3.4). Se realizaron cruzas dirigidas con elección de pareja. Las hembras fueron expuestas a fruta plástica entre dos y seis veces. El estudio de la segunda generación y las disecciones de gónadas se realizaron sólo para las cruzas homotípicas de las líneas Pet-84 y SR-99 y para las cruzas híbridas producidas entre dichas líneas. El estudio se realizó entre agosto y septiembre de 2000.

Resultados

En este caso se observó una mayor variación, que la observada en los experimentos anteriores, en los valores medios de viabilidad máxima tanto en las cruzas heterotípicas como en las homotípicas (Tabla 6.14). En particular VZ-99 x VZ-99 presentó el valor más bajo e Yby-99 x Taf-99 el mayor. Las comparaciones entre las cuatro cruzas posibles en cada combinación de líneas mostró diferencias entre cruzas en varias oportunidades (Tabla 6.15).

Tipo de craza	Cruza	Viabilidad máxima	Proporción machos
Heterotípicas	Pet-84 x SR-98	85.03 ± 10.45 (8)	0.56 ± 0.11 (8)
	SR-98 x Pet-84	73.42 ± 21.89 (11)	0.47 ± 0.05 (9)
	SR-98 x VZ-99	74.70 ± 23.07 (11)	0.51 ± 0.06 (10)
	SR-98 x Yby-99	72.24 ± 19.45 (8)	0.51 ± 0.06 (8)
	Taf-99 x VZ-99	69.04 ± 30.56 (8)	0.57 ± 0.05 (7)
	Taf-99 x Yby-99	57.76 ± 19.07 (7)	0.51 ± 0.08 (5)
	VZ-99 x SR-98	84.62 ± 18.96 (18)	0.51 ± 0.08 (18)
	VZ-99 x Taf-99	84.46 ± 8.78 (7)	0.49 ± 0.06 (6)
	VZ-99 x Yby-99	58.59 ± 25.54 (14)	0.55 ± 0.08 (12)
	Yby-99 x SR-98	81.35 ± 24.98 (16)	0.51 ± 0.06 (15)
	Yby-99 x Taf-99	88.96 ± 8.05 (13)	0.49 ± 0.06 (12)
	Yby-99 x VZ-99	85.86 ± 10.92 (15)	0.51 ± 0.05 (15)
Homotípicas	Pet-84	69.31 ± 16.21 (20)	0.47 ± 0.09 (19)
	SR-98	72.61 ± 19.37 (39)	0.52 ± 0.07 (38)
	Taf-99	76.84 ± 18.89 (69)	0.54 ± 0.08 (64)
	VZ-99	51.33 ± 30.58 (13)	0.47 ± 0.05 (10)
	Yby-99	80.32 ± 15.47 (6)	0.53 ± 0.13 (6)

Tabla 6.14: Viabilidad máxima y proporción de machos de la progenie híbrida para cada tipo de craza entre distintas líneas de laboratorio. Media ± desvío estándar (N).

Con respecto a la viabilidad máxima se encontraron diferencias significativas cuando VZ-99 era una de las poblaciones involucradas y para las cruzas entre Taf-99 e Yby-99 (Tabla 6.15,). Para VZ-99 y SR-98 las dos cruzas híbridas presentaron viabilidades mayores a las cruzas homotípicas y particularmente VZ-99 x SR-98 se diferenció de VZ-99 x VZ-99 ($P < 0.001$) y de SR-98 x SR-98 ($P < 0.05$). En el caso de VZ-99 y Taf-99, VZ-99 x Taf-99 mostró valores de viabilidad mayores a ambas líneas, si bien las diferencias fueron significativas solo cuando se la comparó con VZ-99 x VZ-99 ($P < 0.05$). Taf-99 x VZ-99 mostró una viabilidad intermedia entre las cruzas homotípicas y difirió de VZ-99 x Taf-99 ($P < 0.05$). En el caso de VZ-99 e Yby-99 se observó una

situación similar. Una de las cruzas híbridas aumentó la viabilidad (Yby-99 x VZ-99) y se diferenció de VZ-99 x VZ-99 ($P < 0.001$) mientras que la otra craza híbrida presentó valores intermedios a las dos cruzas homotípicas y se diferenció de la otra craza híbrida ($P < 0.001$). Con respecto a Taf-99 e Yby-99 se observó que Yby-99 x Taf-99 mostró un incremento de la viabilidad con respecto a las cruzas homotípicas mientras que Taf-99 x Yby-99 una disminución pronunciada. Este alejamiento entre ambas cruzas heterotípicas alcanzó significación estadística ($P < 0.05$), mientras que ninguna de ellas se diferenció de las cruzas homotípicas.

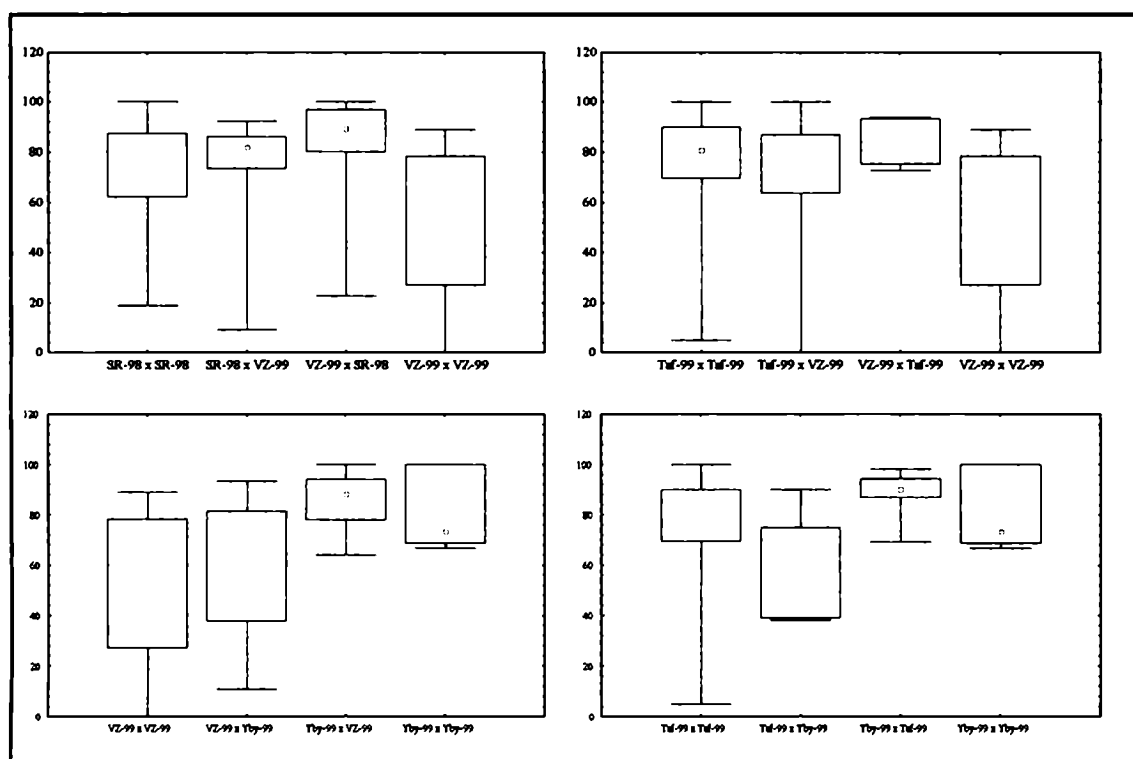


Figura 6.2: Valores de viabilidad de la primera generación para las cruzas entre líneas. Mediana, 1er y 3er cuartiles, máximo y mínimo.

Los valores de proporción de machos en la primera generación más altos se registraron en las cruzas heterotípicas (Tabla 6.14) y también se observaron diferencias significativas entre las cruzas originadas en algunas de las combinaciones de poblaciones (Tabla 6.15, Figura 6.3). Las cruzas realizadas entre Taf-99 y VZ-99 y entre SR-98 y Pet-84 mostraron diferencias significativas. Particularmente, Taf-99 x VZ-99 mostró una mayor proporción de machos que VZ-99 x VZ-99 ($P < 0.05$). En SR-98 y Pet-84, se observó que las cruzas que involucraron hembras Pet-84 presentaron una menor proporción de machos que las que involucraron hembras SR-98. Si bien el

ANOVA mostró diferencias entre grupos, no se detectaron diferencias cuando se analizaron todos los pares posibles (test de Dunn) considerando los cuatro tipos de cruzas. Sin embargo, las diferencias fueron significativas cuando se agruparon las cuatro cruzas en función del origen de la hembra ($H_{(1)} = 7.71$, $P = 0.006$).

Combinación de líneas	Viabilidad máxima		Proporción machos	
	$H_{(3)}$	P	$H_{(3)}$	P
VZ-99 - SR-98	15.67	0.001	4.86	0.183
VZ-99 - Taf-99	11.52	0.009	10.84	0.013
Yby-99 - SR-98	6.17	0.104	1.01	0.798
Yby-99 - Taf-99	13.85	0.003	3.33	0.344
Yby-99 - VZ-99	16.17	0.001	6.04	0.110
SR-98 - Pet-84	5.00	0.172	8.67	0.034

Tabla 6.15: Valores del estadístico H del test de Kruskal-Wallis y significación estadística para viabilidad máxima y proporción de machos de la primera generación híbrida en cada combinación de líneas analizadas.

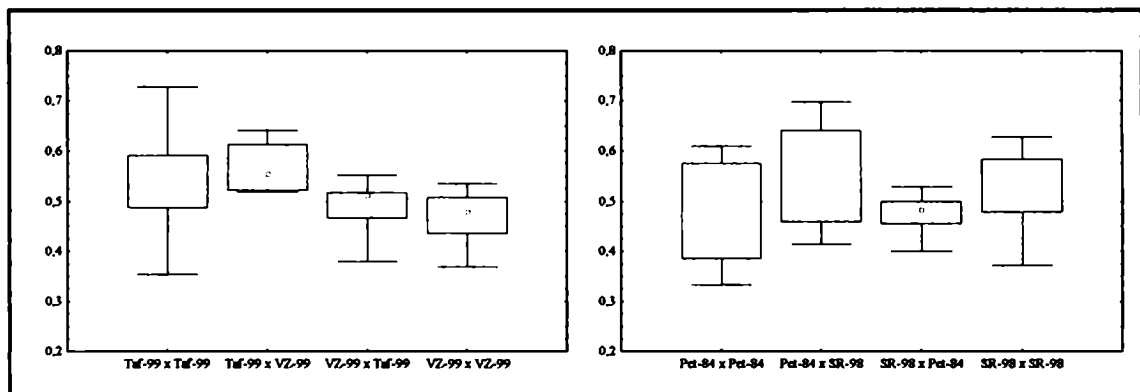


Figura 6.3: Valores de proporción de machos de la primera generación para las cruzas entre líneas. Mediana, 1er y 3er cuartiles, máximo y mínimo.

Con respecto a la segunda generación, se analizaron sólo las cruzas entre SR-98 y Pet-84. Se observó una tendencia hacia una mayor fecundidad en las hembras híbridas con respecto a las hembras provenientes de cruzas homotípicas (Tabla 6.16). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los cuatro grupos ($H_{(3)} = 6.42$, $P = 0.093$), pero sí entre las cruzas homotípicas y las heterotípicas ($H_{(1)} = 4.15$, $P = 0.042$). La proporción de machos mostró el mayor valor en la cruce Pet-84 x SR-98 y el menor en SR-98 x Pet-84 (Tabla 6.16), y se detectaron diferencias entre grupos ($H_{(3)} = 9.86$, $P = 0.020$). El comportamiento fue el mismo al observado en la primera generación. SR-98 x Pet-84 difirió de Pet-84 x SR-98 y Pet-84 x Pet-84 (en ambos casos $P < 0.05$).

Cruza	Proporción machos	Fecundidad
SR-98 x SR-98	0.52 ± 0.05 (21)	15.97 ± 10.05 (22)
SR-98 x Pet-84	0.47 ± 0.06 (13)	18.28 ± 10.33 (13)
Pet-84 x SR-98	0.54 ± 0.07 (11)	19.06 ± 9.89 (11)
Pet-84 x Pet-84	0.53 ± 0.06 (16)	10.88 ± 8.05 (16)

Tabla 6.16: Proporción de machos de la segunda generación y fecundidad de las hembras de la primera generación. Media ± desvío estándar (N).

Las disecciones de gónadas, se practicaron solamente en las cruzas que involucraron a Pet-84 y SR-98. Se detectaron hembras con ambos ovarios atrofiados en las dos cruzas homotípicas y sólo en una de las heterotípicas (Tabla 6.17). Pet-84 x Pet-84 presentó valores de atrofia gonadal altos, las dos cruzas híbridas valores muy bajos o nulos y se observaron diferencias atribuibles al tipo de craza ($\chi^2_{(4)} = 13.67$, $P = 0.034$). En particular SR-98 x Pet-84 presentó menores valores de atrofia gonadal que Pet-84 ($\chi^2_{(2)} = 7.17$, $P = 0.028$). Pet-84 x SR-98 mostró una tendencia similar aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($\chi^2_{(2)} = 5.35$, $P = 0.069$).

Tipo de craza	Origen de la hembra	NN	NA/AN	AA	Flias	%NN	%AA
Heterotípica	SR-98 x Pet-84	58	0	1	1/16	98.31	1.69
	Pet-84 x SR-98	44	1	0	1/10	97.78	0.00
Homotípica	SR-98	97	2	3	4/23	95.10	2.94
	Pet-84	69	5	7	7/17	85.19	8.64

Tabla 6.17: Desarrollo gonadal de las hembras en los cuatro tipos de cruzas posibles entre SR-98 y Pet-84. NN: número de hembras con ambos ovarios normales, NA/AN: uno de los ovarios atrofiado y el otro normal, AA: ambos ovarios atrofiados, Flias: número de familias con al menos una hembra con un ovario atrofiado / familias analizadas en cada craza.

En las cruzas realizadas se detectaron familias con valores bajos de viabilidad asociados a VZ. Asimismo, los huevos de algunas hembras VZ presentaron una morfología diferente a la normal, siendo los mismos más pequeños y menos ahusados. Algunas de estas familias son analizadas y discutidas con mayor detalle en la sección 6.8.

Interpretación

La línea VZ-99 presentó un comportamiento llamativo. Por un lado, mostró los valores de viabilidad más bajos. Asimismo, los híbridos entre esta línea y las líneas SR-98, Taf-99 e Yby-99 presentaron un incremento en la viabilidad que en un caso, llegó a superar a ambas líneas puras (VZ-99 x SR-98). Las cruzas recíprocas no se comportaron de la

misma forma y llegaron incluso a diferir en forma significativa cuando se cruzó VZ-99 con Taf-99 y con Yby-99. Estas diferencias no estuvieron asociadas a un sexo determinado. Para los casos donde se cruzó VZ-99 con SR-98 y Taf-99, las cruzas con machos VZ-99, y hembras de otro origen, presentaron mayores valores, sugiriendo que la baja viabilidad podría estar asociada a la hembra VZ-99. Sin embargo, cuando se la cruzó con Yby-99, el comportamiento fue opuesto, la craza que involucró machos Yby-99 y hembras VZ-99 fue la que experimentó un aumento en la viabilidad. De estas combinaciones de líneas, Taf-99 y VZ-99 también presentó diferencias en la proporción de machos. El comportamiento, nuevamente no fue igual entre las dos cruzas recíprocas, Taf-99 x VZ-99 mostró valores un poco mayores de proporción de machos, aunque similares a Taf-99 y VZ-99 x Taf-99 mostró valores similares a VZ-99, sugiriendo una posible asociación entre el origen del macho y la proporción de sexos de la progenie. Las diferencias encontradas entre las cruzas recíprocas ponen de manifiesto la ocurrencia de mecanismos unidireccionales, sugiriendo una posible participación citoplasmática en la determinación del desempeño de los híbridos.

La interacción de las líneas Taf-99 e Yby-99 también mostró unidireccionalidad de fenómenos. En este caso, la craza Taf-99 x Yby-99 mostró una disminución marcada de la viabilidad y la craza recíproca un incremento. Esto muestra que un análisis de compatibilidad debe, en la medida de lo posible, incluir las dos cruzas recíprocas y las dos líneas que las originan.

En las cruzas entre SR-98 y Pet-84, se encontraron diferencias entre cruzas para la propoción de machos pero no para viabilidad. Las diferencias en este caso, fueron altamente significativas cuando se agruparon las cruzas en función del origen de la hembra. Además, estas diferencias se mantuvieron en la segunda generación, indicando que la distorsión de sexos tiene bases genéticas y posiblemente ligadas al sexo. El análisis de disección de gónadas mostró que las dos cruzas híbridas presentaron el mismo comportamiento, indicando que en este caso no se ganó una mayor información al realizar las dos cruzas recíprocas.

A lo largo de todo este capítulo se presentaron distintas aproximaciones para analizar la compatibilidad post-cigótica entre poblaciones silvestres y líneas de laboratorio y entre distintas líneas. Los resultados mostraron la existencia de compatibilidad entre todas las combinaciones de líneas y/o poblaciones analizadas pero también sugirieron la ocurrencia de ciertos factores genéticos que ocasionaron familias con diversas anomalías a lo largo del desarrollo, ya sea en la primera generación, en la segunda, o en las retrocruzas. Dentro de cada estudio se detectaron patrones propios pero también se vieron anomalías comunes, aún cuando los procedimientos no fueron iguales.

Un análisis global de todas las cruzas obtenidas permitiría destacar estos patrones comunes y sugerir causas o mecanismos. Para realizar dicho análisis, es necesario contar con valores de referencia que caractericen el desempeño normal, o más frecuente, en cruzas homotípicas de una línea de laboratorio. En la siguiente sección se presenta un análisis global de los resultados donde se compara el desarrollo de la progenie de todas las cruzas obtenidas con un control elegido dentro del conjunto de cruzas realizadas a lo largo del estudio de la compatibilidad post-cigótica. Asimismo se presenta un análisis global de los resultados de las disecciones de gónadas.

6.7 Comparación de todas las cruzas realizadas

A lo largo de las distintas pruebas se realizaron cruzas entre distintas poblaciones silvestres y líneas de laboratorio. Algunas de ellas fueron utilizadas en más de una ocasión, por ejemplo Taf-99. Esta línea estuvo involucrada en cruzas con material silvestre como línea de referencia (Sección 6.4), en las pruebas entre líneas donde se obtuvo una de las dos cruzas híbridas (Sección 6.5), y en las pruebas donde se obtuvieron las dos cruzas híbridas (Sección 6.6). Se observó que, a lo largo de los dos años en que se realizaron estas pruebas, el desempeño en el desarrollo de la progenie de esta línea se mantuvo constante. Fue posible entonces caracterizarla y utilizarla como patrón de referencia para analizar el desempeño de las otras líneas y cruzamientos.

Material y métodos

Desarrollo de la progenie

Se caracterizó a Taf-99 teniendo en cuenta la viabilidad y la proporción de machos en la primera generación. Se estudió la distribución de estas variables, se realizaron las transformaciones necesarias para lograr un ajuste a una distribución Normal, y se establecieron los intervalos de confianza. Para la viabilidad en el desarrollo, se consideró que las anomalías genéticas asociadas a la presencia de incompatibilidad post-cigótica se manifiestan en una reducción de los valores medios de esta variable por lo que se definió un valor umbral por debajo del cual se encuentran las familias anormales. Para una línea con buen desempeño se definió que un 10%, o menos, de familias con bajos valores de viabilidad era aceptable. Con respecto a la proporción de machos, también se definió un 10% de familias extremas como aceptable. En este caso, se consideraron anómalos ambos extremos, déficit de machos (valores cercanos a uno) y déficit de hembras (valores cercanos a cero), por lo que se obtuvo un intervalo de confianza que dejara un 5% de casos en cada lado de la distribución.

Los intervalos definidos fueron utilizados para contabilizar cuantas familias presentaron valores por dentro y por fuera del intervalo designado como normal para Taf-99 en todas las cruzas obtenidas, ya sea homotípicas o heterotípicas. Con dichas frecuencias, se realizaron tests de χ^2 de Homogeneidad para determinar cuales eran las líneas, poblaciones o cruzas con frecuencias distintas a la línea de referencia. En los casos donde una de las celdas presentó una frecuencia esperada menor a uno se realizó el test exacto de Fisher (Cochran 1952, 1954, citados en Daniel 1990).

Desarrollo gonadal

Con respecto a la disección de gónadas la comparación entre las distintas cruzas se realizó utilizando las mismas variables que se usaron en las otras secciones (número de hembras con ninguno (NN), uno (AN/NA), o dos ovarios atrofiados (AA), y número de familias con al menos una hembra con un ovario atrofiado). Se agruparon las distintas

familias en función del tipo de cruce (homotípica vs. heterotípica) y del origen de los parentales (población silvestre vs. línea de laboratorio). Se establecieron, entonces, seis categorías. Para las categorías donde se obtuvo más de una combinación de orígenes, o en el caso de las homotípicas, más de un origen, se realizó un test de χ^2 de Homogeneidad. Dentro de las categorías homogéneas, se sumaron todas las cruces y se las comparó con las otras categorías utilizando el mismo análisis.

Resultados

Caracterización de Taf-99

Para la viabilidad en el desarrollo se aplicó la transformación del arcoseno de la raíz cuadrada (Zar 1996). De esta forma se logró el ajuste a la distribución Normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov, $d = 0.117$, $P > 0.05$). El valor umbral de viabilidad aceptable obtenido para la primera generación fue de 50.85%. La proporción de machos ajustó a una distribución Normal ($d = 0.084$, $P > 0.05$), por lo que no fue necesario transformar los datos originales para el cálculo del intervalo de confianza. Los valores obtenidos fueron de 0.40 – 0.68.

Progenie de cruces entre poblaciones silvestres y líneas de laboratorio

El número de familias con valores de viabilidad por debajo del umbral establecido como normal para las distintas cruces entre machos de poblaciones silvestres y hembras de laboratorio se muestran en la Tabla 6.18. GR, SR y PYD presentaron una frecuencia de familias anormales mayor a la registrada para Taf-99 (cruces con valores de $P < 0.05$ en Tabla 6.18). Con respecto a la proporción de sexos, también se encontraron cruces con una frecuencia de familias anormales elevada (Tabla 6.18). SR, AroN y MonP mostraron un mayor número de familias con déficit de machos, mientras que Con, GR y ConSN presentaron más familias con distorsión de sexo en ambas direcciones. No se registraron casos con mayor número de familias con déficit de hembras solamente.

Hembra	Macho	Viabilidad				Proporción machos				
		<50.85	>50.85	$\chi^2_{(1)}$	P ¹	<0.40	>0.68	0.40-0.68	$\chi^2_{(1)}$	P ¹
Taf-99	Taf-99	6	63			2	2	60		
Arg17y-80	Con	1	11	0.00	0.967	2	3	7	12.14	< 0.001
	GR	6	14	6.03	0.014	3	3	7	15.23	< 0.001
	Re	5	16	3.43	0.064	3	0	16	1.73	0.189
	SP	5	24	1.5	0.221	1	1	24	0.06	0.804
	SR	9	9	17.07	< 0.001	3	1	9	6.98	0.008
Taf-99	AroN	5	18	2.79	0.095	3	1	15	3.69	0.055
	ConND	1	5	-	0.456	0	0	6	-	0.693
	ConNG	4	28	0.35	0.552	0	1	28	0.63	0.427
	ConSD	2	15	0.15	0.696	2	0	12	1.04	0.307
	ConSN	0	13	-	0.342	2	2	9	6.98	0.008
	MonP	3	10	2.32	0.128	3	0	8	4.90	0.027
	PYD	3	4	-	0.032	0	0	4	-	0.780
	PYM	1	7	-	0.551	1	0	6	-	0.414
	VZ1G	3	25	0.10	0.511	0	3	24	0.31	0.579
	VZ1N	0	4	-	0.704	1	0	3	-	0.269
	VZ2N	0	11	-	0.399	0	0	9	-	0.584
	VZ3N	2	9	-	0.302	1	0	8	-	0.492
	YuD	2	9	-	0.302	1	0	10	-	0.558

Tabla 6.18: Frecuencia de familias con valores normales y anormales de viabilidad y proporción de machos en la primera generación provenientes de cruces entre machos silvestres y hembras de laboratorio. ¹Los valores de P que no se acompañan del $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad corresponden al test exacto de Fisher.

Con respecto a la segunda generación (Tabla 6.19), se encontraron diferencias en ciertas retrocruzas provenientes de las pruebas entre distintas poblaciones silvestres y Arg17y-80. GR presentó un mayor número de familias con baja viabilidad en la retrocruza paterna, SP mostró lo mismo pero para ambas retrocruzas y además mostró un mayor número de familias con déficit de machos. Para las pruebas entre poblaciones silvestres y Taf-99, en todas las cruces y tanto para viabilidad como para proporción de machos, las frecuencias de familias anormales fueron similares a Taf-99 (Tabla 6.19).

Hembra	Macho	Viabilidad				Proporción machos				
		<50.85	>50.85	$\chi^2_{(1)}$	P ¹	<0.40	>0.68	0.40-0.68	$\chi^2_{(1)}$	P ¹
Taf-99	Taf-99	6	63			2	2	60		
Arg17y-80	Con	0	7	-	0.548	1	0	7		0.455
	GR	5	3	16.95	< 0.001	1	0	9	-	0.527
	Re	3	6	4.73	0.300	1	0	20	0.06	0.801
	SP	3	7	3.93	0.048	4	0	13	4.51	0.034
	SR	3	12	1.65	0.200	1	0	13	-	0.639
Arg17y-80	Con	2	7	-	0.229	2	0	8	-	0.184
	GR	0	10	-	0.431	0	0	10	-	0.552
	Re	2	1	-	0.310	0	0	17	-	0.382
	SP	11	6	26.98	< 0.001	0	1	17	0.01	0.913
	SR	1	17	0.19	0.663	0	0	17	-	0.382
Taf-99	AroN	1	20	0.35	0.556	2	1	17	1.53	0.217
	ConND	0	6	-	0.595	0	0	5	-	0.735
	ConSD	3	13	1.39	0.239	0	1	14	-	0.662
	ConSN	2	11	0.56	0.456	0	0	11	-	0.523
	MonP	1	11	0.00	0.967	1	0	10	-	0.558
	PYD	2	4	-	0.121	0	0	6	-	0.693
	PYM	1	8	-	0.592	0	1	8	-	0.492
	VZ1N	0	3	-	0.767	0	0	3	-	0.829
	VZ2N	0	11	-	0.399	0	0	11	-	0.523
	VZ3N	1	8	-	0.592	0	0	8	-	0.618
	YugD	0	14	1.31	0.252	1	0	13	-	0.639

Tabla 6.19: Frecuencia de familias con valores normales y anormales de viabilidad y proporción de machos en la segunda generación provenientes de cruzas entre machos silvestres y hembras de laboratorio. Para hembras Arg17y-80 el primer grupo de datos corresponde a las retrocruzas vía materna y el segundo a las retrocruzas vía paterna. ¹Los valores de P que no se acompañan del $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad corresponden al test exacto de Fisher.

Progenie de cruzas entre líneas

En este caso también se registraron cruzas con un mayor número de familias con bajos valores de viabilidad que Taf-99 (Tabla 6.20). Particularmente esto ocurrió en Chi-99 x Pet-84, Taf-99 x Yby-99 y VZ-99 x Yby-99. En relación a la proporción de sexos, también se encontraron cruzas con una frecuencia de familias anormales mayor a Taf-99 (Tabla 6.20). Chi-99 x Pet-84 presentó más familias con distorsión de sexo en ambas direcciones, mientras que Taf-99 x Gua-98 mostró una frecuencia elevada de familias con déficit de hembras. En otras cruzas también se vieron varias familias con distorsión de sexos (Tabla 6.20) pero las diferencias no alcanzaron el nivel de significación estadística del 5%.

Cruza	Viabilidad				Proporción machos				
	<50.85	>50.85	$\chi^2_{(1)}$	P ¹	<0.40	>0.68	0.40-0.68	$\chi^2_{(1)}$	P ¹
Taf-99	6	63			2	2	60		
Chi-99 x Gua-98	2	11	0.56	0.456	1	0	12	-	0.555
Chi-99 x Pet-84	4	6	7.74	0.005	2	2	6	10.22	0.001
Gua-98 x SP-98	1	2	-	0.268	0	1	2	-	0.211
Pet-84 x Gua-98	4	12	3.33	0.068	2	1	11	3.24	0.072
Pet-84 x SR-98	0	8	-	0.506	0	1	7	-	0.407
SP-98 x Chi-99	0	7	-	0.548	1	1	5	-	0.089
SP-98 x SR-98	0	12	-	0.369	2	0	9	-	0.181
SR-98 x Chi-99	1	11	-	0.724	1	2	9	-	0.064
SR-98 x Gua-98	0	12	-	0.369	2	0	10	-	0.204
SR-98 x Pet-84	2	9	-	0.302	0	0	9	-	0.681
SR-98 x Taf-99	1	5	-	0.456	0	0	6	-	0.768
SR-98 x VZ-99	1	10	-	0.660	0	0	10	-	0.655
SR-98 x Yby-99	1	7	-	0.551	0	0	8	-	0.708
Taf-99 x Gua-98	2	16	0.10	0.752	1	3	14	4.07	0.044
Taf-99 x VZ-99	1	7	-	0.551	0	0	7	-	0.737
Taf-99 x Yby-99	3	4	-	0.032	0	0	5	-	0.801
VZ-99 x SR-98	1	17	0.19	0.663	1	0	17	0.01	0.913
VZ-99 x Taf-99	0	7	-	0.548	1	0	5	-	0.330
VZ-99 x Yby-99	5	9	7.39	0.007	0	0	12	-	0.608
Yby-99 x SR-98	2	14	0.22	0.639	1	0	14	-	0.600
Yby-99 x Taf-99	0	13	-	0.342	1	0	11	-	0.530
Yby-99 x VZ-99	0	15	1.40	0.236	0	0	15	-	0.546

Tabla 6.20: Frecuencia de familias con valores normales y anormales de viabilidad y proporción de machos en la primera generación provenientes de cruzas entre distintas líneas. ¹Los valores de P que no se acompañan del $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad corresponden a la prueba exacta de Fisher.

Con respecto a la segunda generación, en este caso, se analizó sólo la proporción de machos (Tabla 6.21). Sólo Pet-84 x Gua-98 presentó una frecuencia de familias anormales mayor que Taf-99.

	Proporción de machos			$\chi^2_{(1)}$	P ¹
	<0.40	>0.68	0.40 – 0.68		
Taf-99	2	2	60		
Chi-99 x Gua-98	0	0	11	-	0.523
Chi-99 x Pet84	1	0	8	-	0.492
Gua-98 x SP-98	0	0	3	-	0.829
Pet-84 x Gua-98	2	1	13	4.51	0.034
Pet-84 x SR-98	1	1	9	-	0.211
SP-98 x SR-98	1	0	11	-	0.587
SP-98 x Chi-99	0	1	6	-	0.414
SR-98 x Chi-99	0	0	11	-	0.523
SR-98 x Gua-98	1	1	10	-	0.239
SR-98 x Pet-84	3	0	10	3.7	0.054
SR-98 x Taf-99	1	1	3	-	0.057
Taf-99 x Gua-98	0	1	16	0.00	0.955

Tabla 6.21: Frecuencia de familias con valores normales y anormales de proporción de machos en la segunda generación provenientes de cruza entre distintas líneas de laboratorio. ¹Los valores de P que no se acompañan del $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad corresponden a la prueba exacta de Fisher.

Progenie de líneas puras

El análisis de las cruza entre machos y hembras de una misma línea mostró algunas líneas con un comportamiento distinto a la de referencia (Tabla 6.22). Particularmente Arg17y-80, Chi-99 y VZ-99 presentaron un mayor número de familias con valores de viabilidad por debajo de lo normal. Pet-84 y Gua-98 presentaron un mayor número de familias con distorsión de sexos. Gua-98 tuvo muchas familias con déficit de hembras mientras que en Pet-84, el 32% de las familias presentaron déficit de machos.

Línea	Viabilidad				Proporción machos				
	<50.85	>50.85	$\chi^2_{(1)}$	P ¹	<0.40	>0.68	0.40-0.68	$\chi^2_{(1)}$	P ¹
Taf-99	6	63			2	2	60		
Arg17-80	19	73	4.30	0.038	9	2	70	2.07	0.150
Chi-99	4	5	9.10	0.003	0	2	7	-	0.134
Gua-98	1	27	0.78	0.377	2	4	20	5.30	0.021
Pet-84	4	16	1.99	0.159	6	0	13	8.87	0.003
SP-98	0	9	-	0.467	2	0	7	-	0.134
SR-98	6	33	1.13	0.288	2	0	36	0.04	0.838
VZ-99	6	7	12.29	< 0.001	1	0	9	-	0.473
Yby-99	0	6	-	0.595	1	1	4	-	0.068

Tabla 6.22: Frecuencia de familias con valores normales y anormales de viabilidad y proporción de machos en la primera generación en distintas líneas de laboratorio. ¹Los valores de P que no se acompañan del $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad corresponden a la prueba exacta de Fisher.

Las frecuencias de familias anormales y normales para la proporción de machos de la segunda generación se muestran en la Tabla 6.23. En este caso también se encontraron diferencias entre Gua-98 y Taf-99.

Línea	Proporción de machos			$\chi^2_{(1)}$	P ¹
	<0.40	>0.68	0.40-0.68		
Taf-99	2	2	60		
Chi-99	1	0	6	-	0.414
Gua-98	4	2	15	7.59	0.006
Pet-84	1	0	15	0.00	1.000
SP-98	0	0	8	-	0.618
SR-98	0	1	20	0.06	0.801

Tabla 6.23: Frecuencia de familias con valores de proporción de machos en la segunda generación anormales y normales en distintas líneas de laboratorio.
¹Los valores de P que no se acompañan del $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad corresponden a la prueba exacta de Fisher.

Desarrollo gonadal

Con respecto a las disecciones de gónadas, se observó una gran heterogeneidad dentro de las distintas categorías (ver Tablas 6.2, 6.7, 6.10, 6.13 y 6.16). Esto fue confirmado con el test de $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad ($P < 0.05$ en las categorías silvestre x laboratorio, cruza híbrida entre líneas de laboratorio y líneas de laboratorio puras). Particularmente, dentro de las líneas de laboratorio Arg17y-80 y Taf-99 presentaron frecuencias de hembras disgénicas diferentes ($P < 0.001$). Muchas cruza presentaron muy pocas hembras, o incluso ninguna, con ovarios atrofiados. Esto limitó la validez del test de $\chi^2_{(1)}$ de Homogeneidad ya que muchas celdas presentan valores esperados muy bajos (Cochran 1952, 1954, citados en Daniel 1990). Se decidió entonces, realizar en forma exploratoria un análisis de correspondencias canónicas, utilizando la frecuencia de hembras NN, NA/AN y AA como variables. Para las cruza entre machos silvestres y hembras de laboratorio, se realizaron dos análisis (una para hembras Arg17y-80 y otro para hembras Taf-99).

Las figuras obtenidas con este análisis, permitieron visualizar la heterogeneidad dentro de cada una de las categorías. De las hembras obtenidas de las cruza entre machos silvestres y hembras de laboratorio (Figura 6.4), aquellas que involucraron hembras

Arg17y-80 y machos SR presentaron los mayores valores de atrofia, mientras que en las cruzas realizadas con machos silvestres y hembras Taf-99, se observó una mayor dispersión de las cruzas en los dos componentes extraídos.

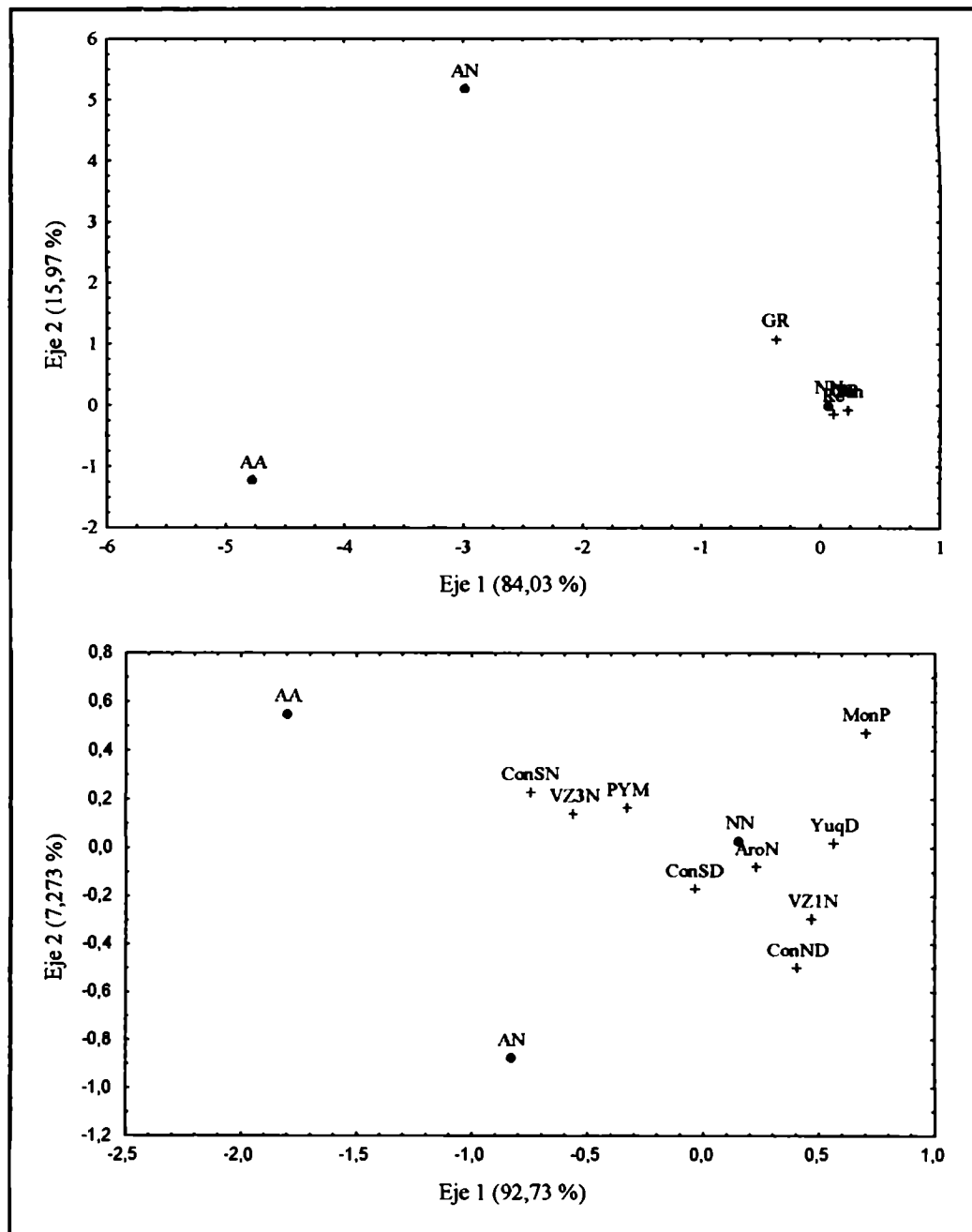


Figura 6.4: Ubicación de las distintas cruzas realizadas con machos de poblaciones silvestres y hembras de laboratorio según el análisis de correspondencias (valor de la varianza explicado en cada eje). a) Cruzas con hembras Arg17y-80. b) Cruzas con hembras Taf-99.

Con respecto a las cruzas realizadas con líneas de laboratorio (Figura 6.5), en las cruzas heteróticas se observó que SP-98 x Chi-99 y Chi-99 x Pet-84 eran las que más se

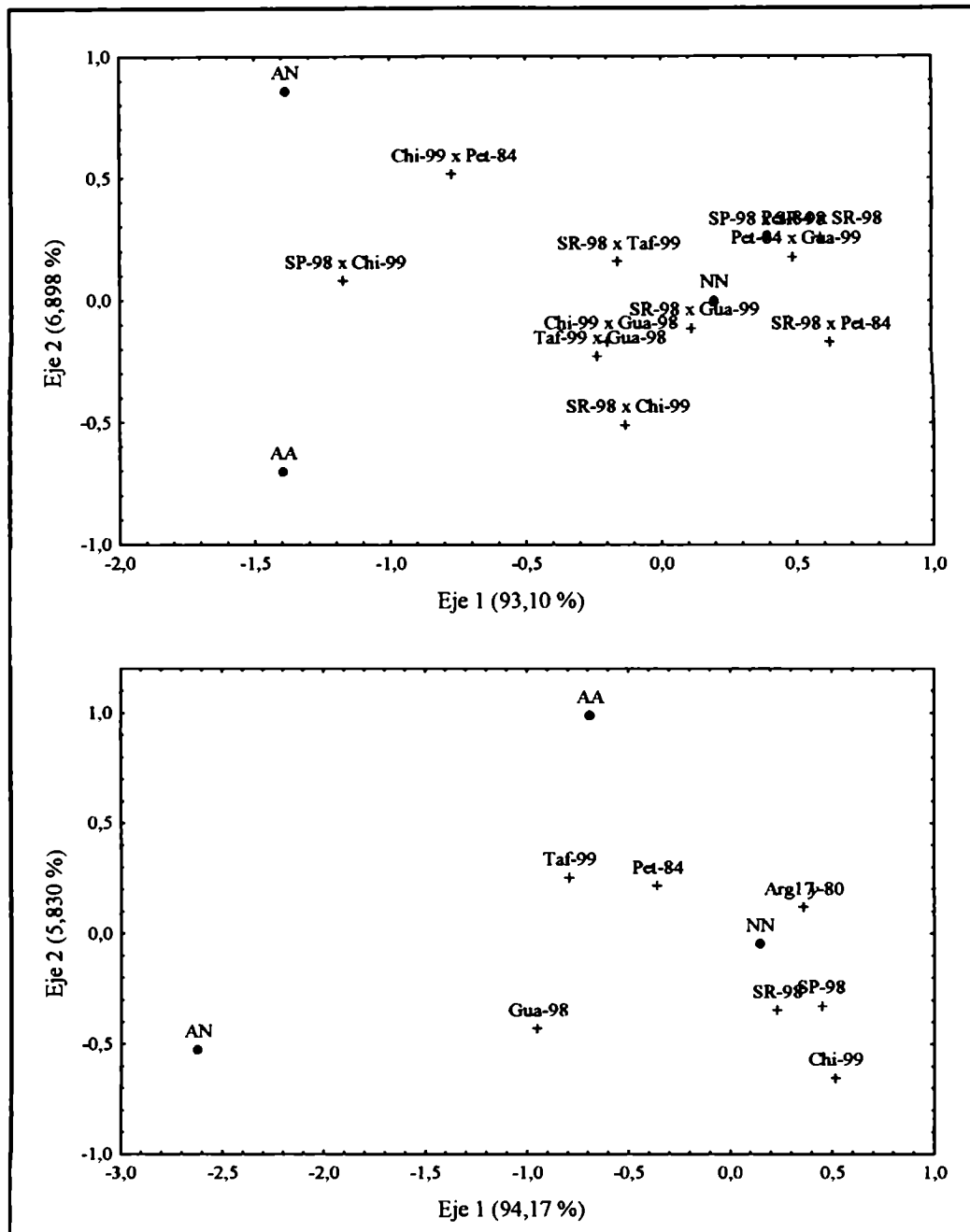


Figura 6.5: Ubicación de las distintas cruzas realizadas con distintas líneas de laboratorio según el análisis de correspondencias (valor de la varianza explicado en cada eje). a) Cruzas heterotípicas. b) Desempeño de las distintas líneas (cruzas homotípicas).

alejan de las otras. En este caso se observó que el primer eje era capaz de explicar el 93.10 % de la varianza registrada y que la posición de las variables AN y AA en dicho eje era la misma, sugiriendo entonces que los casos disgénicos presentaron el mismo grado de atrofia unilateral que bilateral. Para las líneas puras, Gua-98, Taf-99 y Pet-84 fueron las que mostraron un mayor número de hembras con ovarios atrofiados. La gran heterogeneidad registrada dentro de cada grupo evidenció que las cruzas contenidas en

las distintas categorías no presentaban un patrón común y que dicha clasificación no se correspondía con una variable asociada al desarrollo gonadal. Se decidió entonces no realizar el análisis comparativo entre categorías.

Interpretación

En esta sección se analizó el desempeño de distintas líneas y de todas las cruzas híbridas, originadas a partir de machos silvestres con hembras de laboratorio y a partir de distintas líneas entre sí, comparándolas con valores considerados normales. Este tipo de análisis permitió detectar cruzas con una frecuencia de familias con anomalías mayor a lo normal.

Con respecto a las cruzas originadas a partir de machos de poblaciones silvestres y hembras Arg17y-80, se observó que la craza SR x Arg17y-80 presentó un elevado número de familias con valores de viabilidad bajos, seguida de GR x Arg17y-80 y en menor grado de Re x Arg17y-80. SR x Arg17y-80 y GR x Arg17y-80 también presentaron un alto número de familias con distorsión de sexos. La línea Arg17y-80 también presentó una frecuencia de familias con baja viabilidad elevada, por lo que una de las explicaciones posibles a la baja viabilidad detectada para SR x Arg17y-80 es que la misma fue generada por el aporte genético de Arg17y-80 y no por el hecho de tratarse de una craza híbrida. Sin embargo, las diferencias entre Arg17y-80 y Taf-99 ($P = 0.038$) no fueron tan grandes como las observadas entre SR x Arg17y-80 y Taf-99 ($P < 0.0001$), sugiriendo que en la craza híbrida se pusieron de manifiesto anomalías asociadas a la craza en sí misma que no están presentes en Arg17y-80. Estas anomalías podrían estar siendo generadas por la presencia de factores de incompatibilidad. Las diferencias entre SR x Arg17y-80 y Arg17y-80 x Arg17y-80, habían sido observadas como una tendencia en el análisis previo pero no habían alcanzado significación estadística. Esta congruencia en los resultados muestra que ambas aproximaciones se complementan y permiten analizar con mayor detalle los resultados obtenidos. Arg17y-80 no presentó un elevado número de familias con distorsión de sexos, mientras que SR x Arg17y-80 sí lo hizo. Esto puede ser considerado como otra evidencia de que la craza SR x Arg17y-80 mostró un comportamiento diferente que Arg17y-80. GR x Arg17y-80 presentó un comportamiento similar, aunque no tan extremo en viabilidad, ($P = 0.014$)

pero sí en distorsión de sexos ($P < 0.0001$), sugiriendo que GR es una población que, al igual que SR, presenta problemas en los híbridos al ser cruzada con Arg17y-80. La cruce Con x Arg17y-80 presentó un elevado número de familias con distorsión de sexos ($P < 0.001$), por lo que también es posible concluir que esta cruce tuvo un comportamiento distinto a la línea Arg17y-80.

Con respecto a las cruces originadas con machos silvestres provenientes de Entre Ríos y Santa Fé (sección 6.4), la interpretación de los resultados es más directa, ya que en ese caso se utilizaron hembras Taf-99. PYD x Taf-99 presentó un elevado número de familias con bajos valores de viabilidad y AroN x Taf-99 mostró una tendencia similar. Esta última cruce presentó, además, familias donde faltaron los machos. MonP también presentó déficit de machos y ConSN mostró distorsión de sexos hacia ambos lados. Es interesante notar que las tres cruces realizadas con poblaciones provenientes de la provincia de Santa Fé, AroN x Taf-99, MonP x Taf-99 y Re x Arg17y-80, presentaron familias con una proporción de machos menor a 0.5. Esto podría ser tomado como un indicio de que en dicha región existen factores genéticos, o factores de incompatibilidad, que generan este desbalance en la proporción de individuos de cada sexo.

Sería interesante plantearse si en este caso, la elección de una cruce de referencia no pudo haber condicionado el análisis. El hecho que no se hayan detectado cruces con falta de hembras puede ser explicado por las características de Taf-99. Esta línea presenta una proporción de machos un poco apartada de 0.5, lo que generó un intervalo de confianza asimétrico (0.40 - 0.68). Aquellas familias que presentaron una tendencia hacia una falta de hembras probablemente fueron incluidas dentro del intervalo normal. Una posible solución sería utilizar la dispersión obtenida en los datos de Taf-99 para estimar un intervalo de confianza centrado en una media teórica de 0.5.

En las cruces entre líneas también se detectaron cruces con elevada frecuencia de familias con baja viabilidad. La cruce Chi-99 x Pet-84 mostró una mayor frecuencia de familias anormales comparada con Taf-99. En el análisis anterior cuando se comparó esta cruce híbrida con las líneas que la originaron, Chi-99 y Pet-84, no se detectaron

diferencias entre cruzas. Sin embargo, estas dos líneas presentaron un desempeño menor a Taf-99, que, en el caso de Chi-99, fue estadísticamente significativo. Si se considera que las diferencias entre Taf-99 y Chi-99 y entre la craza híbrida y Taf-99 tienen el mismo sentido y magnitud, no se puede inferir la presencia de algún tipo de anomalía asociada a la craza híbrida como se hizo para SR x Arg17y-80 y GR x Arg17y-80. La baja viabilidad se podría deber entonces, a factores asociados a Chi-99.

Taf-99 x Yby-99 también presentó una elevada frecuencia de familias con bajos valores de viabilidad (tres de siete). En este caso las diferencias entre dicha craza heterotípica y Taf-99 alcanzaron significación estadística. Esto no se vio en el análisis anterior. Yby-99 no presentó ninguna familia anormal (de un total de seis analizadas), aunque no pudo diferenciarse de Taf-99 x Yby-99 debido al bajo número de familias analizadas. Las tendencias observadas en este nuevo análisis permiten concluir que la craza híbrida presenta una reducción de la viabilidad en relación con las líneas que la originaron, indicando una posible incompatibilidad entre estos dos orígenes que se manifiesta en una sola dirección y no en la craza recíproca.

La otra craza que presentó un mayor número de familias con baja viabilidad fue VZ-99 x Yby-99. En este caso, la línea VZ-99 también presentó un elevado número de familias con baja viabilidad. No es posible, entonces, inferir que las diferencias encontradas se hayan originado al cruzar esas dos poblaciones o se deban al bajo desempeño que presenta VZ-99. Nuevamente es interesante notar que la craza recíproca no tuvo el mismo comportamiento. Yby-99 x VZ-99 presentó, incluso, una tendencia a aumentar la viabilidad con respecto a las dos líneas que la originaron, como se observó en el análisis anterior.

Con respecto a la proporción de sexos, también se encontraron cruzas que difirieron de Taf-99. Las diferencias observadas entre Chi-99 x Pet-84 y la línea de referencia, pueden ser explicadas al observar el comportamiento de las líneas que las originaron. Chi-99 x Pet-84 presentó familias con déficit de machos y familias con déficit de hembras, mientras que Chi-99 sólo presentó familias con déficit de hembras y Pet-84 sólo con déficit de machos. En este caso en Chi-99 x Pet-84 se manifestaron anomalías

presentes en ambos padres. Este hecho sugiere que los mecanismos involucrados en la distorsión de sexos podrían ser dominantes y actuar en heterocigosis. Lamentablemente para esta cruce en particular no se dispuso de la cruce recíproca.

Es interesante notar, nuevamente, como la incorporación de este nuevo análisis mostró patrones propios de las cruces híbridas: las diferencias en la frecuencia de familias con anomalías en la proporción de machos entre Pet-84 y Taf-99 fueron significativas, mientras que en Chi-99 el bajo número de familias analizadas no permitió diferenciarlas. La diferencia entre Taf-99 x Gua-98 y Taf-99, originada por un déficit de hembras en la cruce híbrida, muestra nuevamente la capacidad de este análisis de detectar anomalías en las cruces. En este caso también Gua-98 presentó familias con déficit de hembras y se diferenció de Taf-99, indicando que Taf-99 x Gua-98 presentó un comportamiento similar a Gua-98 para esta variable. La falta de la cruce recíproca no permite analizar si este comportamiento se debe a la presencia de mecanismos dominantes en Gua-98 o está asociado a una herencia ligada al sexo.

Este nuevo análisis permitió detectar cruces con un alto número de familias con distorsión de sexos hacia ambos lados. En el análisis previo, estas cruces quedaron enmascaradas al presentar una media cercana a 0.50. El desvío estándar resultó elevado, como consecuencia de la presencia de familias extremas a ambos lados de la distribución, lo que no permitió separar grupos con un ANOVA no paramétrico. El nuevo análisis permitió separar estas cruces de las cruces que no presentaron familias con distorsión de sexos y permitió encontrar casos interesantes de anomalías asociadas al hecho de cruzar individuos de dos líneas o poblaciones diferentes y anomalías de posible herencia dominante. Algunas de estas familias fueron analizadas con mayor detalle y son discutidas en la siguiente sección.

Con respecto a la disección de gónadas este nuevo análisis permitió confirmar la presencia de una gran heterogeneidad dentro de las distintas categorías. Este hecho impidió que la hipótesis original (donde se esperaban diferencias entre las cruces homotípicas y heterotípicas) pudiera ser puesta a prueba. La gran heterogeneidad observada y la presencia de al menos una cruce híbrida con síntomas de disgenesia,

sugieren, por un lado, que existen diferencias entre orígenes para el desarrollo gonadal y que, además, existen efectos de incompatibilidad capaces de afectar dicho desarrollo.

6.8 Estudio de casos particulares

Caso 1: Familias derivadas de cruzas GR x Arg17y-80

En las cruzas de GR x Arg17y-80, las familias 36134, 36135, 36137, 36139, 36140 y 36141, presentaron anomalías en el desarrollo y fueron incorporadas al cepario del IGEAF con el objetivo de estudiarlas nuevamente luego de varias generaciones. Las familias 36134 y 36135 correspondieron a las retrocruzas vía paterna y materna, respectivamente, de la familia 35876 que había presentado valores muy bajos de viabilidad. La familia 36137 provino de la retrocruza vía materna de la familia 35877 que había presentado baja viabilidad y déficit de machos. La familia 36139 provino de la retrocruza vía materna de la familia 35878. Estas dos últimas líneas presentaron elevada mortalidad embrionaria en la retrocruza materna y la familia 36137 presentó a su vez, una menor emergencia de adultos. Las familias 36140 y 36141 provinieron de las retrocruzas vía paterna y materna, respectivamente, de la familia 35880. Estas dos familias presentaron distorsión de sexos. En particular se observó un déficit de hembras en la retrocruza vía paterna y un déficit de machos en la retrocruza vía materna. Esta tendencia se mantuvo en las tres ocasiones en que se juntaron huevos y para ambos casos la proporción de sexos fue distinta de 1:1 (Tabla 6.24).

Familia	Cruza	Proporción machos	$\chi^2_{(1)}$	P
36140	35880 x Arg17y-80	0.56 ± 0.03 (3)	5.98	0.015
36141	Arg17y-80 x 35880	0.40 ± 0.01 (3)	4.85	0.028

Tabla 6.24: Proporción de machos en las retrocruzas de la familia 35880 y ajuste a una proporción de 0.5.

En forma simultánea, Fanny Manso estudió los cromosomas mitóticos de células del ganglio neural de larvas del 3^{er} estadio de estas dos familias (Figura 6.6). En la familia 36141, se observó que las hembras presentaron un cromosoma X^c distinto al normal (X⁺). El cromosoma X^c se vio frecuentemente curvado como si los telómeros se atrajeran. Cuando fue posible verlo estriado resultó más corto que el X⁺. Por otro lado,

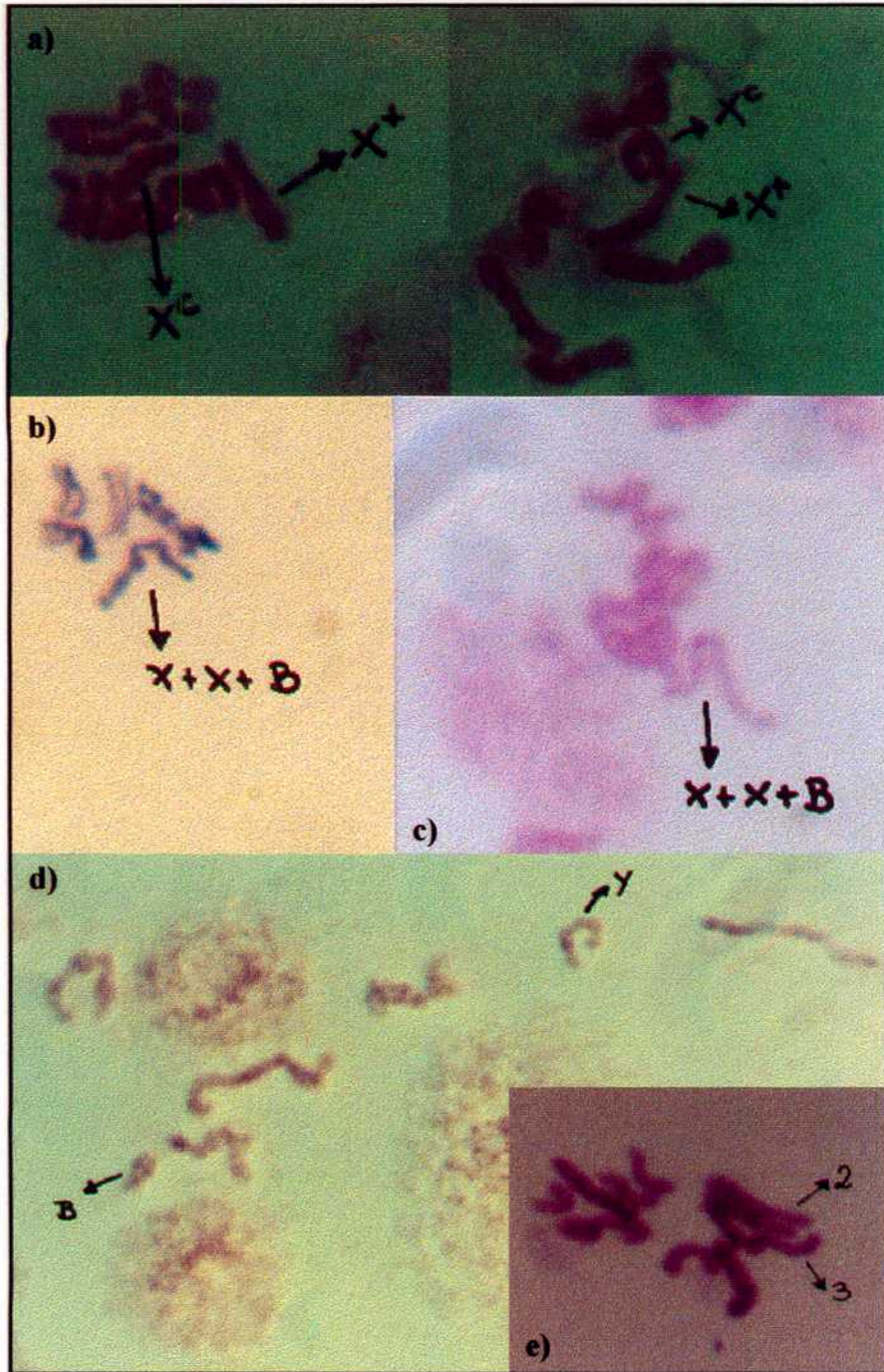


Figura 6.6: Cromosomas mitóticos de individuos derivados de cruces entre GR y Arg17y-80. a) células del ganglio cerebral de larvas del 3^{er} estadio en hembras de la familia 36141 donde se observan los cromosomas X curvo (X^c) y X normal (X^+). b) Metafase de huevo de una hembra de la familia 36140. Se puede observar la presencia de un puente que una ambos cromosomas X. c) Lo mismo en células del ganglio neural de larvas del 3^{er} estadio. d) Metafase mitótica de un macho obtenida en células del ganglio neural de larvas del 3^{er} estadio de la familia 36141. Se puede observar un cromosoma B. e) Metafase mitótica obtenida en células del ganglio neural de larvas del 3^{er} estadio de la Familia 36137. Se puede observar una translocación entre el cromosoma 2 y el cromosoma 3.

los machos de esa familia presentaron un cromosoma Y distinto al esperado, sugiriendo la presencia de un cromosoma B adherido al cromosoma Y. La presencia de estos cromosomas B también fue detectada en hembras. Al analizar la familia 36140 se observaron unas figuras particulares donde, en el caso de las hembras, ambos cromosomas X se hallaban unidos por un puente. Asimismo, en la familia 36137 se observaron individuos heterocigotas para una translocación entre los cromosomas 2 y 3.

Todas estas líneas fueron criadas por más de 24 generaciones siguiendo la metodología estándar (Capítulo 3.3). Pasado este tiempo, se tomaron al azar 10 machos y 10 hembras de cada línea, se los cruzó y se juntaron los huevos de cada hembra, en forma individual. Se analizó la viabilidad y proporción de sexos de cada una de estas nuevas familias. Los resultados se presentan en la Tabla 6.25. Los derivados de las familias 36134 y 36135 presentaron valores de viabilidad bajos y, además, en este caso también se registraron familias con distorsión de sexos.

Línea	Viabilidad	Proporción machos
36134	56.41 ± 23.74 (8)	0.55 ± 0.13 (8)
36135	59.69 ± 23.64 (7)	0.38 ± 0.21 (7)
36137	80.05 ± 6.75 (6)	0.47 ± 0.06 (6)
36139	74.68 ± 20.29 (5)	0.41 ± 0.08 (5)
36140	78.16 ± 6.50 (7)	0.49 ± 0.08 (7)
36141	62.25 ± 19.55 (8)	0.48 ± 0.08 (8)

Tabla 6.25: Viabilidad y proporción de machos en familias originadas de cruza entre GR y Arg17y-80 luego de 24 generaciones bajo cría de laboratorio. Media ± desvío estándar (N).

De las familias obtenidas a partir de la línea 36135, la 39338 presentó los valores extremos de proporción de machos (0.18) por lo que se la estudió durante otra generación. Se dejaron aparear a las hembras libremente con sus hermanos y luego se las separó individualmente para la obtención de huevos. La proporción media de machos obtenida en la progenie fue de 0.46 ± 0.09 en 23 hembras. De las mismas, 6 presentaron déficit de machos. Se tomaron cuatro de esas familias, junto a las dos familias que presentaron los valores más altos de proporción de machos y a cuatro familias que presentaron valores cercanos a 0.50. Se volvió a aparear a las hembras con sus hermanos y se tomaron diez hembras por familia para obtener la siguiente generación y determinar la viabilidad y proporción de machos (Tabla 6.26). En este

caso se observó una importante disminución en la viabilidad y familias con distorsión de sexos en las tres categorías.

PMGA	Familia	Viabilidad	Proporción machos
<0.40	39338-15	33.64 ± 28.09 (10)	0.39 ± 0.12 (5)
	39338-25	52.72 ± 20.74 (9)	0.52 ± 0.12 (8)
	39338-29	50.57 ± 14.62 (9)	0.39 ± 0.08 (9)
	39338-30	37.86 ± 12.25 (10)	0.53 ± 0.16 (10)
0.50	39338-9	18.66 ± 14.44 (10)	0.29 ± 0.18 (5)
	39338-12	51.56 ± 31.24 (10)	0.53 ± 0.08 (8)
	39338-20	27.75 ± 35.02 (8)	0.52 ± 0.10 (3)
	39338-26	46.67 ± 28.75 (9)	0.48 ± 0.08 (8)
>0.55	39338-14	40.16 ± 15.34 (9)	0.47 ± 0.10 (7)
	39338-32	43.15 ± 21.17 (10)	0.53 ± 0.08 (10)

Tabla 6.26: Viabilidad y proporción de machos en familias originadas de la familia 38338 y agrupadas en función de la proporción de machos que presentaron en la generación anterior (PMGA). Media ± desvío estándar (N).

Interpretación

En este caso se detectaron anomalías relacionadas con la proporción de individuos de cada sexo. La falta de hembras en las retrocruzas vía paterna y de machos en las retrocruzas vía materna se presentó en más de una ocasión y se manifestó luego de varias generaciones bajo cría en el laboratorio. Este fenómeno fue visto en asociación con bajas viabilidades en el desarrollo, sugiriendo que la falta de individuos de un sexo con respecto al otro puede estar generada por un factor de mortalidad ligado al sexo. El estudio citológico mostró la existencia de cromosomas B y de un cromosoma X^c menor al estándar. La presencia de cromosomas B ha sido informada para *C. capitata* en otras poblaciones de Argentina (Manso y Lifschitz 1986, Basso y Lifschitz 1995) y en individuos provenientes de poblaciones silvestres de la región de Alto Valle, Patagonia, analizados en años anteriores (Manso, com. pers.). Asimismo, se la asoció con casos de distorsión de sexos (Manso, com. pers.), sugiriendo que aquí también podrían estar involucrados en la ocurrencia de este fenómeno. Sería necesario ampliar el estudio citológico a otras familias derivadas de cruzas GR x Arg17y-80 para poder confirmar esta posible asociación.

Caso 2: Familias con distorsión de sexos en Con x Arg17y-80

En las cruzas entre machos de la población silvestre Con y hembras Arg17y-80, se detectaron familias con distorsión de sexos en las retrocruzas. Las familias 38055 y 38057 mostraron un déficit de hembras en la retrocruza vía materna y de machos en la retrocruza vía paterna. La familia 38059 presentó déficit de machos en la retrocruza vía materna e igual proporción de ambos sexos en la retrocruza vía paterna. La familia 38061 presentó un comportamiento opuesto, déficit de machos en la retrocruza vía paterna e igual proporción en la materna. La familia 38062 presentó déficit de hembras en la retrocruza vía paterna.

En vista de las distorsiones observadas, se tomaron, en las familias donde se dispuso de material, machos de la primera generación híbrida para repetir las retrocruzas vía paterna. Las hembras hermanas, apareadas con dichos machos, fueron colocadas a oviponer para obtener una segunda generación y poder repetir las retrocruzas vía materna. De esta forma se obtuvo la progenie de dos repeticiones de retrocruzas vía paterna de la primera generación híbrida, una repetición para retrocruzas vía materna y una repetición de ambas retrocruzas realizadas con progenie híbrida de la segunda generación. Asimismo, se incluyeron en el análisis las familias 38054, 38056, 38063 y 38069. El número de individuos de cada sexo obtenido para cada caso, así como la proporción de machos y el ajuste a una proporción 1:1 se muestran en la Tabla 6.27.

En todas las retrocruzas vía paterna, las dos repeticiones mostraron el mismo comportamiento. En la familia 38062 se repitió el déficit de hembras. Sin embargo, cuando se realizaron las retrocruzas con la progenie híbrida de la segunda generación no se observó el mismo comportamiento que para la primera. De las familias que habían presentado algún desvío de la proporción 1:1 (38055, 38059 y 38062), ninguna presentó distorsión de sexos en la siguiente retrocruza. Por otro lado, la familia 38089, que no había presentado distorsión de sexos, presentó un déficit de machos.

Familia	Rep	Retrocruza vía materna					Retrocruza vía paterna				
		M	H	Prop	$\chi^2_{(1)}$	P ¹	M	H	Prop	$\chi^2_{(1)}$	P ¹
38054	1	47	43	0.52	0.18	0.673	11	16	0.41	0.93	0.336
	F2	31	31	0.50	0.00	1.000	105	102	0.51	0.04	0.835
38055	1	65	44	0.60	4.05	0.044	11	16	0.41	0.93	0.336
	2						20	16	0.56	0.44	0.505
38056	F2	63	78	0.45	1.60	0.207	243	232	0.51	0.25	0.614
	1	122	112	0.52	0.43	0.513	28	40	0.41	2.12	0.146
38059	2						36	36	0.50	0.00	1.000
	F2	81	83	0.49	0.02	0.876	190	173	0.52	0.80	0.372
38062	1	13	35	0.27	10.08	0.001	17	19	0.47	0.11	0.739
	F2	105	98	0.52	0.24	0.623	186	190	0.49	0.04	0.837
38063	1						27	14	0.66	4.12	0.042
	2						40	19	0.68	7.47	0.006
38089	F2	74	69	0.52	0.17	0.676	241	229	0.51	0.31	0.580
	1						26	20	0.57	0.78	0.376
38089	F2	0	5				33	45	0.42	1.85	0.174
	1						24	22	0.52	0.09	0.768
38089	F2	31	38	0.45	0.71	0.399	40	69	0.37	7.72	0.005

Tabla 6.27: Número de machos (M) y hembras (H) obtenidos para las retrocruzas derivadas de cada familia en las dos repeticiones de la primera generación híbrida (1 y 2) y en la segunda generación híbrida (F2). Proporción de machos (Prop) y $\chi^2_{(1)}$ de Bondad de Ajuste con significación estadística (P) a una proporción de sexos de 0.5.

Interpretación

En este caso se observaron familias que presentaron distorsión de sexos. Al contrario de lo que sucedió con las familias originadas con machos de GR, no se observó una asociación entre la falta de un sexo y el tipo de retrocruza (vía materna o paterna). La congruencia entre las dos repeticiones de la primera generación, en especial en la familia 38062, donde la relación macho:hembra fue de 2:1, sugiere que el fenómeno de distorsión de sexos es repetible y por tanto inherente a las cruza que lo manifestaron. La falta de congruencia entre la primera y segunda generaciones, tiene dos explicaciones posibles, o bien el fenómeno que provoca la distorsión de sexos no se transmite, o bien se transmite pero no se expresa. El hecho de que la familia 38089 haya manifestado déficit de machos en la retrocruza de la segunda generación y no en la primera, apoya la segunda hipótesis. Esto coincide con lo observado en una de las familias derivadas de machos GR, donde en las retrocruzas de la primera generación no

se manifestaron distorsiones de sexos, mientras que en las líneas derivadas, y luego de varias generaciones bajo cría de laboratorio, sí se manifestaron.

Caso 3: Familia 38324

Dentro de las cruzas entre machos SR y hembras Arg17y-80 (Sección 6.3), se obtuvo una familia, la 38324, que presentó bajos valores de viabilidad y distorsión de sexos, particularmente déficit de machos. La primera generación presentó valores de viabilidad del 46.15%. Se obtuvieron un macho y cinco hembras. Dichas hembras fueron retrocruzadas con machos Arg17y-80, formando la familia 38446. Esta familia también presentó bajos valores de viabilidad (55.00% y 45.68% en las dos ocasiones en que se juntaron huevos). Al contar el número de huevos eclosionados se observó la presencia de embriones muertos por lo que se descartó que la baja viabilidad se haya debido a huevos no fecundados. Nuevamente se observó un déficit de machos (en el primer caso emergieron un macho y diez hembras mientras que en el segundo emergieron un macho y once hembras). Estos individuos fueron nuevamente cruzados con Arg17y-80. Uno de los machos fue cruzado con diez hembras Arg17y-80, las cuales fueron colocadas individualmente para obtener los huevos. Se obtuvo progenie de ocho de esas hembras y algunas presentaron valores bajos de viabilidad (Tabla 6.28), pero solo una presentó déficit de machos. Con respecto a las hembras 38446, cada una de ellas fue cruzada con dos machos Arg17y-80 y se les colocó fruta plástica para obtener huevos. Se obtuvieron 18 nuevas familias de las cuales 11 pusieron huevos. Se estudió la viabilidad de 6 de ellas y la proporción de sexos de las 11. Cuatro hembras presentaron valores de viabilidad cercanos o menores al 50% (Tabla 6.28) y una presentó una tendencia hacia un déficit de hembras. De las dos hembras con buenos valores de viabilidad, una presentó un 75% de viabilidad y una proporción de machos de 0.33. De las 11 hembras, 3 presentaron una proporción de machos significativamente menor a 0.5 y ninguna presentó una proporción significativamente mayor (Tabla 6.28). Al sumar la progenie de todas las hembras el déficit de machos se mantuvo significativo.

	Familia	Viabilidad	M	H	$\chi^2_{(n)}$	P ¹	Prop
Macho	38609-2	73.08	9	10	0.05	0.819	0.47
	38609-3	29.63	5	7	0.33	0.564	0.42
	38609-4	15.56	3	4	0.14	0.705	-
	38609-5	51.11	26	25	0.02	0.889	0.51
	38609-7	67.27	34	55	4.96	0.026	0.38
	38609-8	71.05	40	31	1.14	0.285	0.56
	38609-9	16.67	4	2	0.67	0.414	-
	38609-10	60.98	39	40	0.01	0.910	0.49
	Total	48.17 ± 24.15	160	174	0.59	0.443	0.47 ± 0.07
	Hembras	38610	54.29	11	8	0.47	0.491
38611		39.13	9	27	9.00	0.003	0.25
38612		75.00	4	7	0.82	0.366	0.36
38614		-	0	2	2.00	0.157	-
38615		56.52	40	26	2.97	0.085	0.61
38616		-	6	8	0.29	0.593	0.43
38617		50.00	21	13	1.88	0.170	0.62
38669		-	2	4	0.67	0.414	-
38670		-	10	35	13.89	< 0.001	0.22
38671		-	19	29	2.08	0.149	0.40
38672		-	25	18	1.14	0.286	0.58
38674		-	18	15	0.27	0.602	0.55
38675		80.65	32	54	5.63	0.018	0.37
Total		59.26 ± 15.67	197	246	5.42	0.020	0.45 ± 0.14

Tabla 6.28: Viabilidad y proporción de machos (Prop) de la progenie de la retrocruza entre individuos de la familia 38446 y la línea Arg17y-80 a través de un macho (cruzado con varias hembras Arg17y-80) y de varias hembras 38446 (cruzadas cada una con dos machos Arg17y-80). Se presentan los valores de cada nueva familia y la media ± desvío estándar para las dos retrocruzas. Número de machos (M) y hembras (H) obtenidos y $\chi^2_{(n)}$ de Bondad de Ajuste con significación estadística (P) a una proporción de sexos de 0.5.

Algunas de las familias originadas en la segunda retrocruza fueron incorporadas al cepario del Instituto de Genética y criadas por más de 35 generaciones siguiendo la metodología estándar (Capítulo 3.3). Una de ellas, la 38609, fue originada a partir del macho 38446 que se cruzó con las hembras Arg17y-80. La otra, 38670, fue originada a partir de una hembra 38446 y dos machos Arg17y-80. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 20 parejas de cada una de esas líneas y se obtuvo la descendencia para evaluar viabilidad y proporción de machos (Tabla 6.29). En este caso se observó que la reducción en la viabilidad acompañada con la mortalidad de los machos no se mantuvo luego de varias generaciones de cría en el laboratorio.

Línea	Viabilidad	Proporción machos
38609	86.19 ± 13.81 (16)	0.54 ± 0.09 (16)
38670	80.79 ± 26.86 (16)	0.53 ± 0.09 (14)

Tabla 6.29: Viabilidad y proporción de machos en familias originadas a partir de una pareja de dos líneas derivadas de la original 38446. Media ± desvío estándar (N).

Dentro de las otras familias obtenidas a partir de machos SR y hembras Arg17y-80, dos de estas presentaron un comportamiento similar a la 38324 en la primera generación. La 38317 presentó baja viabilidad y pocos machos, mientras que la 38315 presentó déficit de machos con cierta disminución en la viabilidad. Sin embargo, ninguna de estas dos familias presentó déficit de machos en la retrocruza.

Interpretación

Esta familia presentó el comportamiento más extremo de todas las familias analizadas, el que además se manifestó en dos generaciones consecutivas. Este caso cumple con lo propuesto en la regla de Haldane (1922) donde el sexo heterogamético, en este caso los machos, deberían ser los primeros en manifestar evidencias de incompatibilidad, ya sea a través de una disminución en la viabilidad o de la ocurrencia de individuos estériles. Esto ocurre en casos de factores de letalidad asociados al cromosoma X o de incompatibilidades de origen citoplasmático. En este caso el cromosoma X fue aportado por la hembra Arg17y-80, la cual fue analizada en muchas otras cruza, y con machos de otros orígenes, incluyendo al macho Arg17y-80, y si bien Arg17y-80 presentó familias con déficit de machos, la proporción de machos nunca llegó a valores tan extremos como 0.09. Tampoco fue diferente a la registrada para Taf-99. Es posible, entonces, postular que en este caso, el fenómeno debe incluir otros factores aparte del cromosoma X, posiblemente incompatibilidad citoplasmática u otros factores asociados al genotipo paterno y a la unión entre los dos orígenes.

Luego de varias generaciones en cría de laboratorio, el déficit de machos se perdió, y la viabilidad de las líneas aumentó. Probablemente, la distorsión de sexos se mantuvo asociada a viabilidades bajas por lo que fue seleccionada en contra a lo largo del tiempo.

Caso 4: Familia 42525

Dentro de las cruzas entre machos de poblaciones silvestres de las provincias de Entre Ríos y Santa Fé y hembras de Taf-99 (Sección 6.4), se obtuvo la familia 42525, originada de un macho ConNG, que presentó bajos valores de viabilidad sin distorsión de sexos. El valor de viabilidad más alto registrado en las cinco ocasiones en que se juntaron huevos fue 53.33%, mientras que el menor fue 38.78%. Se dejó que las hembras de la progenie copulen con sus hermanos y luego se las separó en frascos individuales para evaluar la viabilidad y proporción de machos de la siguiente generación. La viabilidad mantuvo valores bajos (Media y desvío: 44.44 ± 26.76 , $N = 6$), mientras que la proporción de machos fue igual a la de hembras (Media y desvío: 0.50 ± 0.05 , $N = 5$). Dentro de todas las hembras que pusieron huevos, la que originó la familia 42693 fue la única que presentó un buen desempeño (viabilidad máxima cercana al 90%), mientras que las otras cinco la viabilidad se mantuvo baja.

En forma paralela, se estudiaron los cromosomas politénicos de las cetras espatuladas del macho. Este estudio fue realizado por la Dra. Alejandra Delprat en individuos de la segunda generación y se tomaron individuos de la familia 42694 que presentó baja viabilidad, de la familia 42693 y de la línea Taf-99. En la familia 42694 se encontraron cuatro individuos, en diez analizados, heterocigotas para una translocación entre los cromosomas tres y cuatro (Figura 6.7). Tres individuos presentaron fallas en el apareamiento entre homólogos o asinapsis en el cromosoma 2 (uno en la región 4C-5 y el otro en 2C-4), y dos presentaron una deficiencia en el cromosoma 6 (región 69A). De nueve individuos analizados en la familia 42693 ninguno presentó translocaciones. Se observaron dos individuos con asinapsis en el cromosoma 2 (comprendiendo las bandas 3C-4A en ambos casos), dos con asinapsis en el cromosoma 4 (región 82B-83A en ambos individuos) y los cinco restantes no presentaron anomalías. En Taf-99 se analizaron 11 individuos y en ninguno de ellos se observaron translocaciones. Sin embargo, la presencia de asinapsis así como de deleciones fue más frecuente. Se registraron seis individuos con asinapsis en el cromosoma 2 (todos lo hicieron en la región 2C-3D y dos de ellos además en la región 15A), cinco con asinapsis en el cromosoma 3 (dos en las regiones 39ABC y 42AB, dos sólo en la región 39 y uno sólo

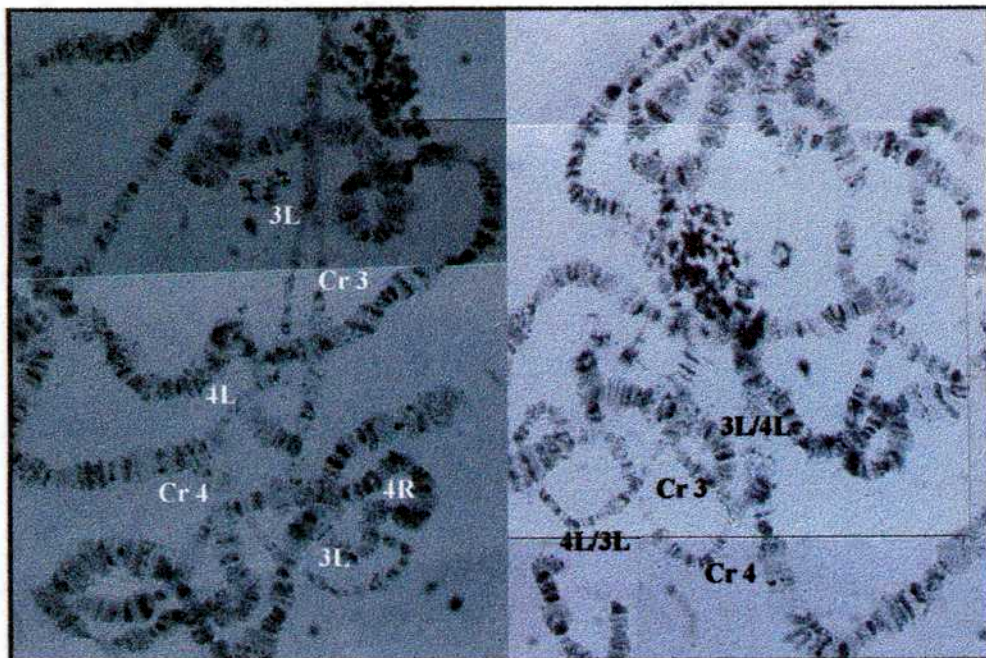


Figura 6.7: Cromosomas politénicos de la ceta espatulada de dos machos la familia 42694 portadores de una translocación entre los cromosomas tres y cuatro (1.000X).



Figura 6.8: Cromosomas politénicos de la ceta espatulada de un macho Taf-99. Se puede observar la deficiencia de la banda 71B en un cromosoma 6 (1.000X).

Cruza	Familia	Cruza original		Familias derivadas	
		Vmax	Prop	Viabilidad máxima	Proporción machos
Gua-98 x Gua-98	39593	92.31	0.73	79.76 ± 15.03 (6)	0.47 ± 0.07 (6)
	39597	90.91	0.69	72.54 ± 2.74 (3)	0.47 ± 0.11 (3)
	39598	80.00	0.22	54.80 ± 27.14 (6)	0.51 ± 0.13 (5)
	40171	55.56	0.42	70.16 ± 26.37 (3)	0.53 ± 0.20 (3)
	40172	83.87	0.65	50.04 ± 30.59 (6)	0.51 ± 0.18 (5)
Pet-84 x Pet-84	39573	50.00	0.58	41.25 ± 12.14 (6)	0.48 ± 0.06 (5)
	39575	86.36	0.33	48.26 ± 22.44 (4)	0.48 ± 0.05 (4)
	39585	78.79	0.61	32.80 ± 11.19 (3)	0.48 ± 0.19 (2)
	39793	71.88	0.37	46.27 ± 20.43 (2)	0.44 ± 0.08 (2)
	40199	41.18	0.40	63.63 ± 17.37 (6)	0.54 ± 0.12 (5)
Gua-98 x Pet-84	39568	84.00	0.76	41.49 ± 23.82 (6)	0.56 ± 0.03 (4)
Gua-98		77.83	0.54	65.65 ± 11.82 (4)	0.48 ± 0.13 (4)
Pet-84		69.31	0.47	74.92 ± 14.42 (5)	0.49 ± 0.10 (4)

Tabla 6.30: Viabilidad y proporción de machos en familias derivadas de cruzas homotípicas y heterotípicas en Gua-98 y Pet-84. Media ± desvío estándar (N). Para cada familia se reportan los valores de viabilidad máxima (Vmax) y proporción de machos (Prop) obtenidos en la cruce original. Asimismo se presentan los valores originales de Gua-98 y Pet-84 (tomados de la Tabla 6.11) y los obtenidos como control al realizar las cruces 12-14 generaciones más tarde.

Se observó una tendencia hacia una disminución en la viabilidad. Esta tendencia fue más pronunciada en Pet-84 y Gua-98 x Pet-84 que en las familias derivadas de Gua-98. Por otra parte, la viabilidad de las líneas (Gua-98 y Pet-84 mantenidas como stock sobre una base de 300-500 individuos por generación), se mantuvo constante a lo largo de las 12-14 generaciones pasadas, tanto para Gua-98 ($P = 0.136$) como para Pet-84 ($P = 0.488$). Con respecto a la proporción de machos, en general, no se observó una tendencia a mantener la distorsión en el mismo sentido que la familia original. Se detectaron 10 nuevas familias con distorsión de sexos y de las cinco familias derivadas de la familia 40172, dos presentaron déficit de machos y dos déficit de hembras (datos no mostrados).

Interpretación

En este caso, se registraron familias con distorsión de sexos y se vio que en general esta característica no se mantuvo luego de un año bajo cría de laboratorio. Solo la familia 40172 mostró una tendencia a seguir presentando un fenómeno de distorsión pero en este caso fue en ambos sentidos, algunas de las familias derivadas presentaron déficit de

machos y otras, déficit de hembras. La disminución en la viabilidad observada en las familias originadas de una pareja, podría ser explicada por un exceso en la endocría.

Caso 6: Familias originadas con machos VZ-99

En las cruzas originadas con machos VZ-99 y hembras SR-98, Yby-99 o VZ-99 (Capítulo 6.6), se encontraron familias con valores de viabilidad bajos (< 50%), intermedios (50-75%) o altos (> 75%). Además, esta línea mostró la presencia de huevos con una morfología distinta a la normal. Con el objeto de determinar si la reducción en la viabilidad se mantenía, se estudio la siguiente generación. Para ello se tomó, para cada tipo de craza, la progenie de la primera generación de una o dos familias dentro de cada categoría de viabilidad, y se dejó que las hembras se apareen libremente con sus hermanos. Luego, se las colocó en frascos individuales y se obtuvo la progenie de cada hembra por separado para determinar viabilidad y proporción de machos. Los resultados se muestran en la Tabla 6.31.

Cruza	Familia	Cruza original		Familias derivadas	
		Vmax	Prop	Vmax	Prop
VZ-99 x SR-98	40991	22.73	0.58	79.62 ± 25.26 (3)	0.42 ± - (1)
	40986	55.22	0.49	33.41 ± 10.52 (8)	0.47 ± 0.19 (3)
	40993	80.00	0.66	65.16 ± 16.10 (14)	0.48 ± 0.06 (11)
	40989	90.91	0.49	51.83 ± 15.21 (13)	0.48 ± 0.15 (6)
	Todas ¹	62.22	0.55	55.06 ± 20.35 (38)	0.48 ± 0.11 (21)
VZ-99 x Yby-99	41041	37.50	0.61	80.41 ± 20.10 (7)	0.59 ± 0.12 (4)
	41038	65.38	0.58	50.87 ± 25.83 (13)	0.45 ± 0.08 (6)
	41044	90.00	0.49	68.24 ± 24.02 (12)	0.53 ± 0.09 (11)
	Todas ¹	64.29	0.56	63.85 ± 26.10 (32)	0.52 ± 0.10 (21)
VZ-99 x VZ-99	41069	37.50	0.51	54.85 ± 18.35 (5)	0.18 ± - (1)
	41070	59.26	0.49	38.30 ± 37.04 (5)	0.55 ± 0.10 (3)
	41056	74.42	0.46	40.44 ± 23.61 (14)	0.35 ± - (1)
	41061	80.39	0.47	47.67 ± 19.58 (9)	0.44 ± 0.09 (5)
	41057	86.00	0.54	34.56 ± 18.75 (8)	0.58 ± 0.11 (4)
	Todas ¹	67.51	0.49	42.38 ± 23.06 (41)	0.48 ± 0.14 (14)

Tabla 6.31: Viabilidad y proporción de machos en familias derivadas de cruzas entre machos VZ-99 y hembras SR-98, Yby-99 y VZ-99. Media ± desvío estándar (N). Para cada familia se reportan los valores de viabilidad máxima (Vmax) y proporción de machos (Prop) obtenidos en la craza original. Asimismo se presentan los valores de todas las familias agrupadas por tipo de craza (Todas), donde para los valores originales se calcularon las medias entre las familias seleccionadas.

Las distintas familias mostraron un comportamiento variado. Se observó una tendencia hacia una viabilidad más elevada si en la cruce anterior la viabilidad había resultado baja. Las familias con alta viabilidad en la cruce original presentaron valores bajos o intermedios en la siguiente generación.

En forma paralela, se realizó un estudio citológico en algunos individuos de esta línea. Nuevamente se analizaron los cromosomas politénicos de las cetos espatuladas de los machos. En dicho análisis se detectaron asinapsis en el cromosoma cinco y algunos individuos, además, presentaron una translocación entre este cromosoma y el tres (Delprat, com. pers.)

Interpretación

En este caso, se analizó el comportamiento de cruces derivadas de una línea que manifestó distintos tipos de anomalías. La viabilidad de la segunda generación fue distinta a la de la primera, la tendencia a un aumento en las cruces que en la primera generación presentaron valores bajos podría estar indicando que la fuerte mortalidad en la primera generación eliminó a los individuos portadores de factores de letalidad embrionaria. Los individuos portadores de translocaciones podrían ser los causantes de esta disminución en la viabilidad, sin embargo, si este fuera el caso, se tendrían que haber mantenido las bajas viabilidades en la siguiente generación. La presencia de estas anomalías junto al hecho que algunas hembras presentaron huevos con una morfología distinta a la normal, sugiere que VZ-99 es una línea con cierto grado de complejidad genética. Si bien con este tipo de análisis no podemos determinar si estas anomalías están asociadas a la actividad de elementos transponibles, sería interesante considerar dicha posibilidad.

6.9 Discusión

En este capítulo se analizó, para *Ceratitis capitata*, la compatibilidad post-cigótica entre dos poblaciones silvestres, entre 19 poblaciones silvestres y una de dos líneas de laboratorio y entre 8 líneas de laboratorio. Siete de estas últimas fueron establecidas

entre 1998 y 1999 por lo que contaron con muy pocas generaciones de endocria al momento del estudio. Asimismo, se comparó el desempeño de todas las cruzas con valores de referencia obtenidos en los distintos experimentos.

El estudio de las cruzas entre las dos poblaciones silvestres mostró la total compatibilidad entre las mismas. No se registró disminución de la viabilidad ni distorsión de sexos y tampoco se registraron casos de atrofia gonadal.

Dentro de las cruzas entre machos silvestres de distintas poblaciones y hembras Arg17y-80, (sin tener en cuenta el caso de Pe, donde el control presentó baja viabilidad y se la analizó por separado, Sección 6.3), se obtuvieron 100 familias híbridas. De las mismas, 26 presentaron una reducción significativa de la viabilidad, 20 presentaron distorsión de sexos y 9 presentaron casos de atrofia gonadal. Algunas de estas familias mostraron las anomalías en forma conjunta. Dentro de todas las poblaciones, las cruzas que involucraron machos SR y GR fueron las que presentaron un mayor número de familias que se apartaron de la normalidad, tanto para parámetros de viabilidad como de distorsión de sexos y atrofia gonadal. El conjunto de resultados sugiere que los machos GR y SR presentaron cierto grado de incompatibilidad con las hembras Arg17y-80. Esta se manifestó tanto en un aumento de la mortalidad de los estadios inmaduros como en un aumento de las hembras estériles. Esta interpretación fue posible luego de haber analizado distintos caracteres y luego de haber incorporado al análisis valores de referencia para todas las cruzas (Sección 6.7). Asimismo, el estudio de familias particulares (Sección 6.8), tanto de GR como de SR, mostró que, los fenómenos encontrados tienen una base genética, e incluso uno de ellos (distorsión de sexos entre individuos de las retorcruzas originadas vía materna y paterna), se volvió a manifestar luego de muchas generaciones bajo cría de rutina.

En las cruzas entre SR y Arg17y-80 se encontraron casos de elevada mortalidad de machos, y en una familia (38324) la mortalidad fue muy pronunciada. Este fenómeno ha sido observado en otro género de la familia Tephritidae (Selivon *et al.* 1999). En dicho caso, dos poblaciones de *Anastrepha fraterculus* mostraron, en una de las cruzas híbridas, una elevada mortalidad de los machos de la primera generación. Este hecho

fue observado en cruzas masivas y no en cruzas derivadas de parejas. Los valores obtenidos sugirieron que la manifestación del mismo, en estas dos poblaciones, es generalizada, y se postuló que las dos poblaciones corresponderían a dos especies de reciente formación y en los inicios del aislamiento reproductivo. Si bien, en nuestro caso no se detectó una presencia generalizada, la fuerza con que se presentó en la familia 38324 sugiere la presencia de un factor de incompatibilidad entre los dos orígenes involucrados.

Dentro de las cruzas que involucraron a Taf-99 como línea de referencia, se obtuvieron 184 familias. De las mismas 26 presentaron baja viabilidad y 21 distorsión de sexos. Con respecto a las familias con atrofia gonadal, de once entradas analizadas, considerando distintos orígenes y distintos hospederos, aquella que involucró machos MonP presentó una frecuencia de familias anormales significativamente menor a Taf-99. El resto de las cruzas no presentaron diferencias significativas, si bien VZ3N mostró una tendencia hacia un aumento en el número de familias digénicas. Las distintas anomalías registradas no fueron observadas para un mismo origen, como sucedió en SR y GR, por lo que no fue posible identificar poblaciones cuyos machos presentarían síntomas claros de incompatibilidad con las hembras Taf-99.

Con respecto al estudio entre líneas con distinto origen e historias de colonización, se realizaron 22 cruzas híbridas entre 8 líneas y se obtuvieron 245 familias híbridas y 193 familias homotípicas. La proporción de familias con problemas de viabilidad o de distorsión de sexos fue igual para ambos tipos de cruzas. Con respecto a la atrofia gonadal se observó un gradiente dentro de las líneas puras que fue desde líneas sin casos de atrofia (Chi-99) hasta líneas con un 30% de las hembras con al menos un ovario no desarrollado en 6 de 9 familias analizadas (Taf-99). Los híbridos resultantes mostraron un comportamiento intermedio o similar a uno de los progenitores. En un caso, SP-98 x Chi-99, presentó mayor número de hembras con atrofia gonadal que las líneas parentales, sugiriendo la ocurrencia del fenómeno de disgenesia híbrida.

Si bien a lo largo de este estudio se detectó un sólo caso claro de disgenesia híbrida es posible arribar a conclusiones interesantes si se lo analiza junto a los casos registrados

en la literatura para esta especie y se los compara con los registrados para *Drosophila melanogaster*. El fenómeno de digenesia informado en *Ceratitis capitata* no fue exactamente igual al informado para *D. melanogaster*. Una de las principales diferencias entre la disgenesia reportada en *D. melanogaster* (revisado en Kidwell 1982) y la reportada en *C. capitata* por Torti *et al.* (1994), es que en la primera, el fenómeno se manifiesta al cruzar poblaciones del campo, o de reciente introducción, con líneas con muchas generaciones en el laboratorio. En el caso informado para *C. capitata*, la disgenesia se manifestó entre líneas de distinto origen pero todas bien establecidas en el laboratorio. Con respecto a los resultados presentados por Spinoglio *et al.* (1997), la situación fue similar en el sentido de que se presentó al cruzar dos líneas de laboratorio, pero difirió en otros aspectos, como ser falta de sensibilidad a la temperatura.

Si bien en los estudios anteriores se había informado la ocurrencia de este fenómeno en esta especie, hasta ahora no se habían realizado estudios en poblaciones silvestres. En el presente trabajo, se buscaron, por primera vez, evidencias de la presencia de disgenesia entre poblaciones silvestres y líneas de laboratorio además de buscarla en las cruzas entre distintas líneas. Los híbridos derivados de la cruce entre las poblaciones silvestres de SP y Re no mostraron síntomas de disgenesia. En las cruzas entre machos provenientes de las poblaciones silvestres de GR, SR y VZ3N, y hembras de laboratorio, se observó un mayor número de familias con hembras cuyos ovarios estaban atrofiados, que en las cruzas homotípicas. Si bien no se contó con las cruzas homotípicas entre machos y hembras silvestres para poder evaluar si el aumento en el número de hembras y familias disgénicas se debió a una manifestación de incompatibilidad o a factores aportados por los machos silvestres independientemente del origen de las hembras, el hecho que las hembras de SP y Re no hayan presentado ningún caso de ovarios atrofiados permite inferir que las otras poblaciones tampoco los habrían presentado y, por lo tanto, los valores observados son síntomas de disgenesia. Asimismo, SP y GR manifestaron incompatibilidades con Arg17y-80 en otros atributos (viabilidad y distorsión de sexos), reforzando lo expuesto anteriormente. Esta afirmación debe ser tomada con precaución y requiere la confirmación luego de incorporar las dos cruzas homotípicas, y de ser posible las dos heterotípicas. En el caso

de cruzas entre líneas de laboratorio, y como se mencionó anteriormente, la craza SR-98 x Chi-99 manifestó dicho fenómeno.

El conjunto de los resultados obtenidos permiten sugerir que el fenómeno de disgenesia dentro de *C. capitata* está fuertemente asociado a la interacción entre ciertos orígenes, ya sea poblaciones silvestres o líneas de laboratorio, y no corresponde a un fenómeno solamente relacionado con el tiempo bajo cría artificial, o de aislamiento genético, sugiriendo una historia distinta a la que se propone para *Drosophila melanogaster*. En este trabajo no se encontró una asociación entre el número de generaciones bajo cría y la manifestación del fenómeno. Distintas líneas originadas en fechas cercanas y sometidas a las mismas condiciones de cría mostraron un comportamiento muy diferente con respecto al desarrollo ovárico.

Durante la manifestación de la disgenesia híbrida, se produce un bloqueo en la oogenesis que resulta en un defecto en las gónadas a nivel estructural (Schafer *et al.* 1979). En *D. melanogaster*, la interrupción del desarrollo se produce temprano durante la organogénesis del ovario y resulta en casos de esterilidad unilateral o, más comúnmente bilateral. En el caso de *C. capitata*, Torti *et al.* (1994) y Spinoglio *et al.* (1997) reportaron ejemplos de ambos tipos de atrofia gonadal, si bien no brindaron un valor de incidencia. Aquí, el único caso registrado de disgenesia híbrida mostró niveles de esterilidad unilateral altos (igual proporción que los casos bilaterales), mientras que las líneas que originaron esa craza no presentaron ningún caso. Las otras cruzas que también presentaron niveles importantes de atrofia unilateral fueron Chi-99 x Pet-84, Chi-99 x Gua-98 y Taf-99 x Gua-98. Dentro de las líneas puras tanto Pet-84 como Gua-98 y Taf-99 mostraron altos valores de atrofia unilateral, por lo que, en estos casos, es posible concluir que los casos de atrofia gonadal no son casos debidos solamente a un problema de hibridez o incompatibilidad entre orígenes. Por otro lado, es interesante mencionar que SR-98 x Chi-99 mostró un elevado número de familias (6 de 12), con al menos una hembra con un ovario atrofiado, mientras que los parentales presentaron niveles mucho más bajos (Tabla 6.13), sugiriendo que las hembras provenientes de cruzas híbridas entre estas dos líneas también presentan un cierto grado de disgenesia.

En *D. melanogaster*, la esterilidad resultante de la interacción entre líneas P y M es, en promedio, más frecuente en hembras que en machos (Kidwell *et al.* 1977). Esto es una excepción a la regla de Haldane (1922), en donde se espera que el sexo heterogamético presente mayor mortalidad y esterilidad. Los mecanismos de herencia de la disgenesia híbrida, donde intervienen los componentes nucleares y citoplasmático, podrían brindar una posible explicación (Kidwell y Novy 1979). En *C. capitata*, Torti *et al.* (1994) reportaron ejemplos de atrofia gonadal en machos, si bien no brindan un valor de incidencia del mismo. En el presente trabajo se practicaron disecciones sobre algunos machos (datos no mostrados). Se descartó esta información porque las diferencias en morfología entre lo que fue clasificado como un testículo normal y uno atrofiado (basando esto en los pocos casos de atrofia masculina encontrados), no resultaron tan evidentes como en las hembras. Se temió entonces incurrir en un nivel de error experimental que invalide los resultados, imposibilitando un análisis más completo.

El fenómeno de disgenesia híbrida está positivamente correlacionado con la temperatura, tanto en *D. melanogaster* (Kidwell *et al.* 1977, Engels y Preston 1979, Kidwell y Novy 1979), como en *C. capitata* (Torti *et al.* 1994, 1997). Aquí, las progenies se criaron a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$), por lo que es posible proponer que algunas de las cruzas híbridas que mostraron un leve grado de disgenesia (SR-98 x Chi-99, Chi-99 x Pet-84), habrían resultado disgénicas a temperaturas mayores. Es muy llamativo el hecho de que Chi-99 este siempre involucrada.

Otros fenómenos asociados a la disgenesia híbrida son la presencia de reordenamientos cromosómicos (Kidwell y Lisch 1997, 2001) y la ocurrencia de mutaciones espontáneas. Es interesante notar que Taf-99 presentó un número importante de familias disgénicas. Esta línea fue analizada citológicamente y se detectaron anomalías cromosómicas como la falta de apareamiento entre cromosomas homólogos en tejidos politénicos (asinapsis) y la presencia de deleciones o deficiencias. Si bien no es posible todavía establecer una relación directa entre los dos fenómenos, no deja de ser interesante destacar la ocurrencia simultánea de los mismos. Además, en las cruzas entre machos GR y hembras Arg17y-80 y entre machos ConNG y hembras Taf-99 se detectaron individuos con translocaciones, sugiriendo la ocurrencia de estos

reordenamientos en la naturaleza. Si bien no se puede asegurar que estas se deban a la presencia de transposones activos, se puede sugerir que sería al menos una casua posible. Con respecto a las mutaciones espontáneas, a lo largo del estudio, se detectaron híbridos en la segunda generación que presentaron mutaciones en el patrón de coloración de los ojos en una familia, 41893, originada de un macho ConSN y una hembra Taf-99. Este fenómeno se registró en las dos ocasiones en que se juntaron huevos y tanto en machos como en hembras. Es interesante mencionar que esta cruce presentó además un número importante de hembras con ovarios atrofiados (Figura 6.4).

Los resultados obtenidos a lo largo de las distintas secciones de este capítulo permiten concluir que en *Ceratitis capitata* no existen fuertes evidencias de incompatibilidad post-cigótica entre distintas poblaciones y líneas de laboratorio. Sin embargo, se manifiestan también, en ciertas combinaciones de orígenes, casos de baja viabilidad, asociados a un sexo o no, y de esterilidad. Con respecto a la viabilidad y proporción de sexos, se observó unidireccionalidad de respuesta en las cruces recíprocas sugiriendo la acción de mecanismos citoplasmáticos. El estudio del desarrollo ovárico permitió detectar una cruce con síntomas de claros de disgenesia híbrida y otras que mostraron una tendencia hacia la manifestación del fenómeno. Asimismo, se incorporó un análisis global que permitió comparar las cruces obtenidas en distintos experimentos. Por último, el estudio de las familias particulares permitió comprobar la estabilidad de algunos fenómenos y postular una posible asociación entre la ocurrencia de anomalías fenotípicas y la presencia de rearrreglos cromosómicos. El conjunto de los resultados permite concluir que en las cruces analizadas el nivel de compatibilidad post-cigótica es alto, salvo en los casos particulares de SR x Arg17y-80, GR x Arg17y-80 y SP-98 x Chi-99 donde se evidenció cierto grado de incompatibilidad. Sería interesante confirmar estos resultados y ampliar este estudio a poblaciones cercanas a las recién mencionadas.

7. Discusión General y Conclusiones

7.1 Discusión

El uso extendido de la técnica del insecto estéril (TIE) para controlar y/o erradicar poblaciones silvestres de *Ceratitis capitata*, una de las principales plagas frutícolas y hortícolas del mundo, ha generado, en muchos grupos de investigación, estudios tendientes a incrementar los conocimientos sobre la biología reproductiva de esta especie (Aluja y Norbom 2000).

El movimiento migratorio de esta plaga en los últimos 150 años llevó a *C. capitata* a colonizar nuevas áreas y a expandir el número de hospederos que utiliza (White y Elson Harris 1994). Esto generó posiblemente bases para la diferenciación genética (Roderick 1996). Asimismo, la posibilidad de criarla en condiciones artificiales dentro del laboratorio llevó a la acumulación de diferentes líneas de cría en laboratorios de todo el mundo, muchas de las cuales nunca recibieron un nuevo aporte de material genético silvestre. Las presiones de selección a las que fueron sometidas las distintas poblaciones y líneas seguramente llevó a la divergencia genética (Roush y Hooper 1995). Todo esto provocó que *C. capitata* se convirtiera en un modelo biológico interesante para la investigación de temas relacionados con el éxito reproductivo de los individuos, los procesos de estructuración de las poblaciones, la biología evolutiva y la compatibilidad reproductiva.

El presente trabajo de tesis evaluó la presencia de manifestaciones de algún grado de incompatibilidad entre material genético de distintos orígenes con especial interés en aspectos que puedan en alguna medida afectar el éxito de la TIE en esta plaga.

Los resultados obtenidos en el estudio de la compatibilidad para el apareamiento mostró patrones de comportamiento que en general coincidieron con lo informado en otros estudios (McInnis *et al.* 1996, Cayol 2000a, Lance *et al.* 2000, Calcagno 2001, o ver Eberhard 2000 y Cayol 2000b para una revisión). Por un lado, no se detectaron evidencias de aislamiento entre dos poblaciones silvestres. Por el otro, las hembras de

laboratorio mostraron una mayor receptividad mientras que los machos de laboratorio mostraron una menor competitividad en comparación con individuos silvestres (Capítulo 4). Las hembras de dos poblaciones (SR y Con), mostraron una tendencia hacia una falta de aceptación de los machos de laboratorio, sugiriendo un cierto grado de aislamiento. Los casos de incompatibilidad conocidos fueron asociados a los procesos de cría en el laboratorio (Eberhard 2000 y Cayol 2000b) y en realidad son casos de falta de competitividad por parte de los machos de laboratorio. McNinnis *et al.* (1996) detectó un caso de resistencia comportamental en una población silvestre. Esta fue la primera vez que se propuso la presencia de incompatibilidad como consecuencia de cambios en las hembras silvestres. Lamentablemente, este fenómeno de resistencia no pudo ser estudiado desde el punto de vista genético debido a su pronta desaparición en la naturaleza (McInnis 1999).

Con respecto a la relación entre el éxito copulatorio y el éxito post-copulatorio, Arnqvist y Danielsson (1999), comprobaron en un grupo de patinadores (Homoptera: Gerridae) que la selección sexual pre-copulatoria y post-copulatoria pueden ser antagonistas debido a las limitaciones de producir esperma. Los machos con alta frecuencia de cópula (alto éxito pre-copulatorio) pasan en promedio una menor cantidad de esperma en cada cópula, ya que no logran recuperarse y por tanto tienden a fertilizar menos huevos (bajo éxito post-copulatorio) que los machos con menor frecuencia de cópula, pero probablemente mayor éxito post-copulatorio.

En el estudio del comportamiento de recópula, es interesante destacar que no se observó una asociación entre la cantidad de cópulas alcanzadas por un macho a lo largo de cuatro días (medida de su éxito copulatorio) y la propensión a la recópula de la hembra que se apareó por primera vez con ese macho (medida de su éxito post-copulatorio). Esta falta de asociación significa, desde un punto de vista práctico, que las características relacionadas con la aptitud para el apareamiento en los machos no pueden ser usadas para predecir el comportamiento post-copulatorio de la hembra (medida indirecta del éxito post-copulatorio del macho). Si bien se mostró que no siempre las distintas etapas del éxito reproductivo están correlacionadas, sería interesante analizar cómo un excesivo gasto energético y/o de recursos en las primeras

podría resultar en una falla en las siguientes. Asimismo, hay que considerar que para poder determinar el verdadero éxito reproductivo de un macho, se debe evaluar el desempeño a lo largo de toda su vida, y no un comportamiento puntual, como por ejemplo, la respuesta post-copulatoria despertada en una sola hembra.

Este estudio mostró que la asociación entre la propensión a la recópula y la duración de la primera cópula, en unos casos fue significativa y en otros no. Esto muestra nuevamente que se debe evitar el uso de ciertas variables como medidas indirectas del éxito post-copulatorio. La demostración de que los machos de laboratorio pierden cierta capacidad de reducir la receptividad de la hembra y que la irradiación afecta aspectos del comportamiento post-copulatorio, como la duración del período refractario, deben ser consideradas un estímulo suficiente para planificar estudios en una escala mayor que permitan determinar el verdadero impacto de la recópula en el campo.

También se mostró la ocurrencia de recópulas inmediatas, incluso en hembras silvestres, hecho que fue anteriormente cuestionado por algunos autores (revisado en Eberhard 2000). Katiyar y Ramírez 1973 propusieron que la recópula inmediata no depende de la cantidad de esperma transferido. Esto, sumado a la correlación negativa entre el número de cópulas alcanzadas a lo largo del experimento y el período refractario de las hembras (Capítulo 5.2), y a la asociación entre la propensión a la recópula y la hora de inicio de la primera cópula (Capítulo 5.3, Tablas 5.17 y 5.18), podría apoyar la idea de que la actividad de la hembra tiene un fuerte efecto en la propensión a la recópula. Por otro lado, Camacho (datos no publicados citados en Briceño y Eberhard 1996) y Yuval (com. pers.) comentan sobre una falla en la transferencia de esperma de aproximadamente el 10% de las cópulas (en Eberhard 2000 se presentan más valores). La tasa de recópula observada, en el caso de las pruebas con hembras silvestres, es llamativamente similar, dejando planteada la hipótesis de que las hembras que no hayan recibido y/o almacenado esperma luego de la primera cópula sean las que reaparearon. Lamentablemente como a las hembras que reaparearon se les permitió completar la segunda cópula, no fue posible determinar la presencia, o no, de esperma del primer macho en las espermotecas. En base a lo observado, y a las evidencias presentadas por otros autores, es posible aventurar que existe un nivel de receptividad propio de la

hembra, tal vez relacionado con su fecundidad (ver Blay y Yuval 1999), además de una capacidad de reacción frente a los estímulos del macho, quien intenta disminuir la receptividad de la misma, posiblemente para evitar la competencia espermática y maximizar así su paternidad.

En el estudio de la compatibilidad post-cigótica tampoco se detectaron casos de incompatibilidad en forma generalizada. Sin embargo, para todas las variables analizadas (viabilidad, relación macho:hembra y desarrollo de los ovarios) y en la mayoría de las cruzas, se observaron familias con anomalías, evidenciando incompatibilidad entre algunos orígenes. En el caso puntual de atrofia gonadal, se postuló que este fenómeno ocurre cuando se produce la interacción entre dos orígenes particulares y no está asociado al encuentro entre poblaciones silvestres, o líneas con pocas generaciones bajo cría artificial y líneas con muchas generaciones en el laboratorio como se observó en *Drosophila melanogaster*. Cuando la disponibilidad de material lo permitió y se realizaron las dos cruzas recíprocas, se observó que el comportamiento no fue similar entre las mismas, llevando a proponer la presencia de factores citoplasmáticos (Werren 1997) y a recomendar, para estudios futuros, la realización de un análisis que involucre las cuatro cruzas posibles.

Es interesante destacar que la población de Santa Rosa (SR), Catamarca, mostró cierto grado de incompatibilidad con la línea Arg17y-80 en varias etapas del proceso reproductivo. Las hembras silvestres (SR) mostraron una tendencia a aparearse con machos de su mismo origen y a rechazar machos Arg17y-80. Además, en las cruzas originadas entre los machos silvestres y las hembras Arg17y-80, se registraron reducciones en la viabilidad, familias con distorsión de sexos, un caso extremo de mortalidad prácticamente total de machos, y un aumento significativo en el número de familias con hembras con al menos un ovario atrofiado. Sería interesante poder confirmar este fenómeno y extenderlo a otras poblaciones cercanas u hospederos y líneas de laboratorio. En el caso de General Roca (GR), Río Negro, también se observó una tendencia hacia una falta de compatibilidad post-cigótica pero, lamentablemente, no se contó con los datos de las pruebas de compatibilidad para el apareamiento en jaulas de campo.

Los resultados obtenidos aquí no sólo aportan bases para la mejora de ciertos aspectos de la TIE sino que permiten aventurar hipótesis sobre el éxito reproductivo de los individuos y la compatibilidad reproductiva entre orígenes.

7.2 Conclusiones

En este trabajo se estudió por primera vez de una manera integral la incipiente incompatibilidad que aparece entre poblaciones de diferenciación muy reciente. Se hicieron estudios que abarcaron los comportamientos previos a la cópula, los posteriores a la cópula pero previos a la fecundación, y los que ocurren luego de que el embrión ha iniciado su desarrollo.

Los resultados mostraron que en esta especie los ejemplos de incompatibilidad para el apareamiento son escasos, es posible identificar factores que condicionan la decisión de la hembra de volver a copular luego de una primera cópula, y que es posible realizar una búsqueda sistemática y extensiva de factores reductores de viabilidad, distorsionadores de la proporción entre los sexos, o causantes de atrofia gonadal. Debe destacarse que la presencia de estos factores fue documentada tanto al cruzar poblaciones naturales con las líneas de laboratorio como al cruzar distintas líneas entre sí.

Las conclusiones teóricas más importantes de esta tesis son, por un lado, la confirmación del concepto ampliamente aceptado, pero no tan ampliamente documentado con estudios integrales, de que el proceso de aparición de incompatibilidad reproductiva, clave en el proceso de especiación, ocurre 'de abajo para arriba', con la aparición de problemas reproductivos en los híbridos antes de que sea posible detectar síntomas de aislamiento etológico. Por otro lado, se propone que la visión tipológica y estática con la que la mayoría de los biólogos experimentales tratamos a las especies sea reemplazada por una visión plástica y dinámica, aún para el caso de un insecto que ha colonizado muy recientemente los sitios de donde se tomaron las muestras ($<10^3$ generaciones para las poblaciones naturales de Argentina, $<10^2$ para

las artificiales), y que ha pasado por repetidos cuellos de botella con la pérdida de variabilidad genética que esto conlleva.

Desde el punto de vista aplicado es posible concluir que parece poco probable que se presenten problemas de incompatibilidad para el apareamiento si se utilizan insectos de diferente origen para criar y liberar machos estériles en forma masiva. Sin embargo, los resultados presentados aquí indican que se debería incluir en las pruebas de calidad de toda nueva cepa, la evaluación de su capacidad de reducir la receptividad de la hembra para una segunda cópula, así como el éxito copulatorio con hembras inseminadas previamente. Por otra parte, si bien la búsqueda de síntomas de disgenesia como indicadores de la presencia de elementos transponibles no parecería tan necesaria en vista del éxito que ha tenido recientemente la identificación de vectores de transformación en esta especie, los repetidos inconvenientes encontrados por los insectarios al tratar de incorporar nuevo fondo genético a sus colonias de cría masiva podrían muy bien encontrar su explicación en la presencia de factores causales de incompatibilidad post-cigótica como los que se informan aquí.

Yai'a Teresa

Cláudia

8. Referencias Bibliográficas

- Agresti, A.** 1996. An introduction to categorical data análisis. Wiley-Interscience Publication. 103-144.
- Alcock, J.** 1994. Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annu. Rev. Entomol.* 39:1-21.
- Alcock, J. y Gwynne, D. T.** 1991. Evolution of insect mating systems: the impact of individual selectionist thinking. En Bailey, W. J. y Ridsdill-Smith, J. [Eds.] *Reproductive Behaviour of Insects. Individuals and Populations.* 10-41.
- Aluja, M. y Liedo, P.** 1993. *Fruit Flies, Biology and Management.* Springer Verlag, New York. 492 pp.
- Aluja, M. y Norbom, A. L.** 2000. Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior. [Eds.] CRC Press. Washington DC. 944 pp.
- Alvarado, L. y Rittaco, M.** 1990 Manejo Integrado de Moscas de los Frutos. Seminario-Taller. INTA-CNEA.
- Andersson, M. e Iwasa, Y.** 1996. Sexual Selection. *TREE* 11:53-58.
- Arnqvist, G. y Danielsson, I.** 1999. Postmating sexual selection: the effects of male body size and recovery period on paternity and egg production in a water strider. *Behav. Ecol.* 10(4):358-365.
- Aruani, R., Ceresa, A., Granados, J. C., Taret, G., Peruzzotti P. y Ortiz, G.** 1996. Advances in the National Fruit Fly Control and Eradication Program in Argentina. En Mc Pheron y Steck [Eds.] *Fruit Fly Pests. A World Assessment of their Biology and Management.* St. Lucie Press. 521-530.
- Back, E. A. y C. E. Pemberton.** 1918. The Mediterranean Fruit Fly in Hawaii. *ESDA Bulletin* Num. 640. Washington, D.C., United States Department of Agriculture, USA. 119 pp.
- Barker, J. S. F.** 1962. Studies of selective mating using the yellow mutant of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 47:623-640.
- Barron, A. B.** 1999. Anaesthetizing *Drosophila* for behavioral studies. *J. Insect Physiol.* 46: 439-442.

- Basso, A. y Lifschitz, E.** 1995. Size Polymorphism of the X-chromosome due to attachment of a B-chromosome in the Medfly. *Brazil. J. Genet.* 18(2):165-171.
- Bateman, A. J.** 1949. Analysis of data on sexual isolation. *Evolution* 3:174-177.
- Bateman, M. A.** 1972. The Ecology of Fruit Flies. *Annu. Rev. Entomol.* 17:493-518.
- Bingham, P. M., Kidwell, M. G. y Rubin, G. M.** 1982. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the *P* element, a P-strain-specific transposon family. *Cell.* 29:995-1004.
- Bishop Y. M., Fienberg, S. E. y Holland, P. W.** 1975. Discrete multivariate analysis: theory and practice. MIT Press.
- Blackman, R. K., Grimaila, R., Koehler, M. M. D. y Gelbart, W. M.** 1987. Mobilization of *hobo* elements residing within the decapentaplegic gene complex: suggestion of a new hybrid dysgenesis system in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 49:497-505.
- Blay, S. y Yuval, B.** 1997. Nutritional correlates of reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Anim. Behav.* 54:59-66.
- Blay, S. y Yuval, B.** 1999. Oviposition and fertility in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): effects of male and female body size and the availability of sperm. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92(2):278-284.
- Bloem, K., Bloem, S., Rizzo, N. y Chambers, D.** 1993a. Female Medfly refractory period: effect of male reproductive status. En Aluja, M. y Liedo, P. [Eds.] *Fruit Flies: Biology and Management*. Springer-Verlag. 189-190.
- Bloem, S., Bloem, K., Rizzo, N. y Chambers, D.** 1993b. Female Medfly refractory period: effect of first mating with sterile males of different sizes. En Aluja, M. y Liedo, P. [Eds.] *Fruit Flies: Biology and Management*. Springer-Verlag. 191-192.
- Boake. C. R., DeAngelis, M. P. y Andreadis, D. K.** 1997. Is sexual selection and species recognition a continuum? Mating behavior of the stalk-eyed fly *Drosophila heteroneura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12442-12445.
- Bodenheimer, F. S.** 1951. *Citrus Entomology in the Middle East*. W. Junk, The Hague, XII 663 pp.
- Boller, E. F. y Chambers, D. L.** 1977. Quality control: an idea book for fruit fly workers. *IOBC/WPRS Bull.* 1977/5.

- Boller, E. F., Katsoyannos, B. L., Remund, U. y Chambers, D. L.** 1981. Measuring, monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Wied.) 1. The RAPID quality control system for early warning. A. Agrew. Entomol. 92:67-83.
- Bonizzoni, M., Malacrida, A. R. Guglielmino, C. R., Gomulski, L. M., Gasperi, G. y Zheng, L.** 2000. Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. Insect Mol. Biol. 9(3):251-261.
- Bregliano, J. C. y Kidwell, M. G.** 1983. Hybrid dysgenesis determinants. En Shapiro, J. A. [Ed.]. Mobile Genetics Elements. Academic Press. 363-410.
- Briceño, R. D. y Eberhard, W. G.** 1998. Medfly courtship duration: a sexually selected reaction norm changed by crowding. Ethol. Ecol. Evol. 10:369-382.
- Briceño, R. D. y Eberhard, W. G.** 1999. Decisions during courtship by wild and mass-reared male and female medflies. Actas de la reunión del grupo de investigación coordinado por FAO/IAEA sobre 'Medfly Mating Behaviour Studies under Field Cage Conditions'. 29 de junio - 3 de julio, Antigua, Guatemala.
- Briceño, R. D., y Eberhard, W. G.** 2000. Possible Fisherian changes in female mate-choice criteria in a mass-reared strain of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 93, 343-345.
- Briceño, R. D. Ramos, D. y Eberhard, W. G.** 1996. Courtship behavior of male medflies (*Ceratitidis capitata*, Diptera: Tephritidae) in captivity. Fla. Entomol. 79:130-143.
- Bucheton, A., Paro, R., Sang, H. M., Pelisson, A. y Finegan, D. J.** 1984. The molecular basis of I-R hybrid dysgenesis: identification, cloning and properties of the *I* factor. Cell 38:153-163.
- Bundgaard, J. y Christiansen, F. B.** 1972. Dynamics of polymorphisms: I. Selection components of *Drosophila melanogaster*. Genetics 71:439-460.
- Calcagno, G. E.** 2001. Comportamiento Reproductivo en la Mosca del Mediterráneo, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) y su aplicación en programas de control genético. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 209 pp.
- Calcagno, G. E., Vera, M. T., Manso, F., Lux, S. A., Norry, F. M., Munyiri, F. N., y Vilardi, J. C.** 1999. Courtship behavior of wild and mass-reared Mediterranean

- fruit fly (Diptera: Tephritidae) males from Argentina. *J. Econ. Entomol.* 92:373-379.
- Calkins, C. O. y Webb, J. C.** 1983. A cage and support framework for behavioral tests of fruit flies in the field. *Fla. Entomol.* 66(4):512-514.
- Carson, H. L. y Templeton, A. R.** 1984. Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: the founding of new populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 15:97-131
- Carracedo, M. C., Asenjo, A. y Casares, P.** 1998. Inheritance mode of *Drosophila simulans* female mating propensity with *D. melanogaster* males. *Heredity* 89(1):101-104.
- Cavalloro, R.** 1989. Fruit flies of economic importance 87. A. A. Balkema, Róterdam, The Netherlands.
- Cavalloro, R. y Delrio, G.** 1970. Studi sulla radiosterilizzazione di *Ceratitidis capitata* Wiedeman e sul comportamento dell'insetto normale e sterile. *Redia* LII 511-547.
- Cayol, J. P.** 2000a. World-wide Sexual Compatibility in Medfly, *Ceratitidis capitata* (Wied.), and its implications for SIT. En Tan, K-H. [Ed.] Area-wide control of fruit flies and other insect pests. 657-665.
- Cayol, J. P.** 2000b. Changes in sexual behavior and life history traits of Tephritid species caused by mass-rearing processes. En Aluja, M. y Norbom, A. L. Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior. [Eds.] CRC Press. Washington DC. 843-860
- Cayol, J. P., Vilardi, J. C., Rial, E. y Vera, M. T.** 1999. New indices and method to measure the sexual compatibility and mating performance of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) laboratory-reared strains under field cage conditions. *J. Econ. Entomol.* 92:140-145.
- Chambers, D. L., Calkins, C. O., Boller, E. F., Itô, Y. y Cunningham, R. T.** 1983. Measuring, monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Wied.). 2. Field tests for confirming and extending laboratory results. *Z. Angrew. Entomol.* 95:285-303.
- Chapman, T., Liddle, L., Kalb, J. M., Wolfner, M. F. y Partridge, L.** 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by accessory gland products. *Nature* 373:241-244.

- Chapman, T., Miyatake, T., Smith, H. K., y Partridge, L.** 1998. Interactions of mating, egg production and death rates in females of the Mediterranean fruitfly, *Ceratitis capitata*. Proc. R. Soc. Lond. B. 265:1-17.
- Christenson, L. D., y R. H. Foote.** 1960. Biology of fruit flies. Annu. Rev. Entomol. 5: 171-192.
- Civetta, A., y Singh, R. S.** 1999. Broad-sense sexual selection, sex gene pool evolution, and speciation. Genome 42:1033-1041
- Cladera, J. L.** 1995. Self-Sexing Strain of *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) Based on a Gene that Affects the rate of Development. Ann. Entomol. Soc. Am. 88:353-356.
- Cladera, J. L., Vera, M. T., Calcagno, G., Vilardi, J. C. McInnis, D. O. y Field Working Group.** 2002. Mating Competitiveness in Field Cages of Cast-191, a promising Genetic Sexing Strain of the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Argentina. Ann. Entomol. Soc. Am. 95(1):133-138.
- Cochran, W. G.** 1952. The χ^2 Test of Goodness of Fit. Ann. Math. Statist. 23:315-345. Citado en Daniel W. W. 1990. Applied nonparametric statistics. 2^{da} Ed.PWS-KENT.185-187.
- Cochran, W. G.** 1954. Some Methods for Strengthening the common χ^2 Tests Biometrics, 10:417-451 Citado en Daniel W. W. 1990. Applied nonparametric statistics. 2^{da} Ed.PWS-KENT.185-187.
- Cosenzo, E., Spinetta de Ruiz, M. y D'Angelcola, M. E.** 1997. Programa Nacional de Erradicación y Control de Moscas de los Frutos - PROCEM. Actas del I Taller de Trabajo sobre Avances en Investigación y Apoyo Científico al Programa Nacional de Erradicación y Control de Moscas de los Frutos - PROCEM. 27-29 de mayo, Buenos Aires, Argentina.
- Crampton, J. M.** 1993. Genetic engineering of insects and applications in basic and applied entomology. En Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques. Vic Library Cataloging in Publication Data. 33-47.
- Crozier, R. H. y Page, R. E.** 1985. On being the right size: male contributions and multiple mating in social Hymenoptera. Behav. Ecol and Sociobiol. 18:105-115.

- Cunningham, R. T., Routhier, W., Harris, E. J., Cunningham, G., Tanaka, N., Johnston, L., Edwards, W. y Rosander, R.** 1980. A case study: eradication of medfly by sterile-male release. *Citrograph* 65(3):63-69.
- Curtis, C. F.** 1985. Genetic control of insect pests: growth industry or lead balloon? *Biol. J. Linn. Soc.* 26:359-374.
- Darwin, C.** 1871. *The descent of man, and selection in relation to sex.* London Murray.
- De Longo, O., Colombo, A., Gomez-Riera, P. y Bartolucci, A.** 2000. The use of massive SIT for the control of the Medfly, *Ceratitis capitata* (Wied.), Strain SEIB 6-96, in Mendoza, Argentina. En Tan, K-H. [Ed.] *Area-wide control of fruit flies and other insect pests.* Penerbit Universiti Sains Malaysia Press, Malasia. 351-360.
- Delprat, M. A.** 1999. Estudio de reordenamientos polimórficos e inducidos en los cromosomas politénicos de la mosca del Mediterráneo: *Ceratitis capitata*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 151 pp.
- Delprat, M. A., Stolar, E. C., Manso, F. C. y Cladera, J. L.** Genetic stability of sexing strains based on the locus *sw* of *Ceratitis capitata*, Wied. *Genetica.* En prensa.
- Delrio, G., y Cavalloro, R.** 1979. Influenza dell'acoppiamento sulla la recettivita sessuale e sull'ovideposizione in femmine di *Ceratitis capitata* Widemann. *Entomologica Bari* 15:127-143.
- De Meyer, M.** 2000. Phylogeny of the Genus *Ceratitis* (Dacinae: Ceratitidini) En Aluja, M. y Norbom, A. L. [Eds.] *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior.* eds. CRC Press. Washington DC. 409-428.
- Díaz-Fleicher, F. y Aluja, M.** 2000. Behavior of Tephritid Flies: A historical perspective. En Aluja, M. y Norbom, A. L. [Eds.] *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior.* eds. CRC Press. Washington DC. 39-69.
- Dobzhansky, Th.** 1937. *Genetics and the Origin of Species.* Columbia University Press, New York. 2^{da} Edición 1941, 3^{era} Edición 1951.
- Dobzhansky, Th.** 1940. Speciation as a stage in evolutionary divergence. *Am. Nat.* 74:312-321.
- Doncaster, C. P., Pound, G. E. y Cox S. J.** 2000. The ecological cost of sex. *Nature.* 404:281-285

- Drew, R. A. I. y Yuval, B.** 2000. The evolution of fruit fly feeding behavior. En Aluja, M. y Norbom, A. L. *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior*. [Eds.] CRC Press. Washington DC. 731-749.
- Eberhard, W. G.** 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press, USA. 501 pp.
- Eberhard, W. G.** 2000. Sexual behavior and sexual selection in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Dacinae: Ceratidini). En Aluja, M. y Norbom, A. L. [Eds.] *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior*. CRC Press. Washington DC. 459-489.
- Eberhard, W. G., y Cordero, C.** 1995. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. *TREE* 10(12):493-496
- Eberhard, W. G. y Pereira, F.** 1995. The process of intromission in the Mediterranean fruit fly: abundance of stored sperm affected by duration of copulation and affecting egg hatch. *J. Econ. Entomol.* 65:914-915.
- Emlen, S.T. y Oring, L. W.** 1977. Ecology, Sexual Selection, and the Evolution of Mating Systems. *Science* 197:215-223.
- Engels, W. R.** 1979a. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: rules of inheritance of female sterility. *Genet. Res.* 33:219-236.
- Engels, W. R.** 1979b. Extrachromosomal control of mutability in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4011-4015.
- Engels, W. R.** 1983. The *P* family of transposable elements in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 17:315-344.
- Engels, W. R.** 1992. The origin of *P* elements in *Drosophila melanogaster*. *BioEssays.* 14(10):681-686.
- Engels, W. R. y Preston, C. R.** 1979. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the biology of female and male sterility. *Genetics* 92:161-174.
- Engels, W. R. y Preston, C. R.** 1984. Formation of chromosome rearrangements by *P* factors in *Drosophila*. *Genetics* 107:657-678.
- Evgen'ev, M. B., Yenikolopov, G.N., Peunova, N.I. y Ilyin Y. V.** 1982. Transposition of mobile genetics elements in interspecific hybrids of *Drosophila*. *Chromosoma* 85:375-386.

- Farias, G. J., Cunningham, R. y Nakagawa, S.** 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.
- Féron, M.** 1962. L'instinct de reproduction chez la mouche mediterraneenne des fruits. *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt. Trypetidae). Comportment sexuel. – Comportement de ponte. *Rev. Pathol. Veg. d'Entomol. Ag. Fra.* 41:1-129.
- Field, S. A., Kaspi, R., y Yuval, B.** Why do calling medflies cluster? Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution. *Fla. Entomol.* En prensa
- Field, S. A.; Taylor, P. W. y Yuval, B.** 1999. Sources of variability in copula duration of Mediterranean fruit flies. *Entomol. Exp. Appl.* 92:271-276.
- Field, S. A. y Yuval, B.** 1999. Nutritional status affects copula duration in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Insecta: Tephritidae). *Ethol. Ecol. Evol.* 11(1):61-70.
- Fisher, 1930.** *The Genetical Theory of Natural Selection.* Clarendon Press, Oxford.
- Fletcher, B. S.** 1989. Life history strategies of tephritid fruit flies. En Robinson, A. y Hooper, G. [Eds.] *Fruit Flies. Their Biology, Natural Enemies and Control V3B.* Elsevier. 195-208.
- Foster, S. A.** 1999. The geography of behaviour: an evolutionary perspective. *TREE* 14(5):190-195.
- Fowler, K. y Partridge, L.** 1989. A cost of mating in female fruitflies. *Nature* 338:760-761.
- Franz, G., Gencheva, E. y Kerremans, P.** 1994. Improved stability of genetic sex-separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genome* 37:72-82.
- Fried, M.** 1971. Determination of sterile-insect competitiveness. *J. Econ. Entomol.* 64:869-872.
- Frissolo, M.S.** 2000. Programa de Control y Erradicación de Moscas de los Frutos en la Provincia de La Rioja. Actas del II Taller Internacional de moscas de los frutos, 9-11 de Octubre. Buenos Aires, Argentina.
- Gage, M. J. G.** 1991. Risk of sperm competition directly affects ejaculate size in the Mediterranean fruit fly. *Anim. Behav.* 42: 1036-1037.

- Gage, M. J. G.** 1998. Influences of sex, size, and symmetry on ejaculate expenditure in a moth. *Behav. Ecol.* 9(6):592-597.
- Hägele, K.** 1987. Non-reciprocal gonadal dysgenesis in *Chironomus thummi* hybrids: temperature sensitivity of female sterility. *Dev. Genet.* 8:17-26.
- Hägele, K. y Oschmann, B.** 1987. Non-reciprocal gonadal dysgenesis in hybrids of the chironomid midge *Chironomus thummi*. III. Germ line specific abnormalities. *Chromosoma* 96:50-54.
- Haisch, A.** 1970. Some observations on decreased vitality of irradiated Mediterranean fruit flies. En *Sterile-male technique for control of fruit flies*. IAEA, Vienna. 71-75.
- Haldane, J. B. S.** 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *J. Genet.* 12:101-109.
- Handler, A. M., McCombs, S. D. Fraser, M. J. y Saul, S. H.** 1998. The lepidopteran transposon vector *piggyBac* mediates germline transformation in the Mediterranean fruitfly *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 6:241-253.
- Harris, D. J., Wood, R. J., y Bailey, S. E. R.** 1988. Two-way selection for mating in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. App.* 47:239-248.
- Hatcher, M.** Selfish-genetic elements. *TREE* 15(7):271-277.
- Hendrichs, J., Franz, G. y Rendon, P.** 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.; Katsoyannos, B., Gaggi, K. y Wornoayporn, V.** 1996. Competitive behavior of males of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, genetic sexing strain Vienna-42. En *Mc Pheron, B. A. y Steck, G. J. [Eds.] Fruit fly pest: a world assesment of their biology and mangement*. 405-414.
- Hendrichs, J.; Katsoyannos, B. I.; Papaj, D. R. y Prokopy, R. J.** 1991. Sex differences in movement between natural feeding and mating sites and trade offs between food consumption, mating success and predator evasion in Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecología* 86:223-231.
- Hendrichs, J., Katsoyannos, B. I., Wornoayporn, V. y Hendrichs, M. A.** 1994. Odour-mediated foraging by yellow-jacket wasps (Hymenoptera: Vespidae):

- predation on leks of pheromone-calling Mediterranean fruit fly males (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 99:88-94.
- Hendrichs, M. A. y Hendrichs, J.** 1998. Perfumed to be killed: interception of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) sexual signaling by predatory foraging wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91:228-234.
- Hibino, Y. e Iwahashi, O.** 1991. Appearance of wild females unreceptive to sterilized males in Okinawa Is. in the eradication program of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillet (Diptera: Tephritidae). *Appl. Entomol. Zool.* 26:265-267.
- Houck, M. A., Clark, J. B., Peterson, K. R. y Kidwell, M. G.** 1991. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* 253:1125-1229.
- Hunt, M. K.** 2000. Sexual Selection in the Mediterranean Fruit Fly. Tesis de Doctorado de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad de Manchester, Reino Unido. 169 pp.
- IAEA, International Atomic Energy Agency.** 1985. The Application of Genetic Engineering and Recombinant DNA Technology in the Development of Genetic Sexing Mechanisms for the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wied). Actas de la reunión de consultores. Diciembre 4-6, Viena, Austria. IAEA. 1-18.
- IAEA, International Atomic Energy Agency.** 1994. Genetic Engineering Technology for the Improvement of the Sterile Insect Technique. Actas de la reunión de trabajo final del grupo de investigación coordinado. Noviembre 21-25, Viena, Austria. IAEA.
- IAEA, International Atomic Energy Agency.** 1998. A Manual of Quality Control for Fruit Flies. Version 4.0, Vienna, Austria. 52 pp.
- IAEA, International Atomic Energy Agency.** 2001. Quality Assurance in Mass-Reared and Released Fruit Flies for Use in SIT Programmes. Actas de la reunión de trabajo del grupo de investigación coordinado. Noviembre 19-23, Mendoza, Argentina. IAEA en prensa.
- Jamart, J. A., Carracedo, M. C. y Casares, P.** 1993. Sexual isolation between *Drosophila melanogaster* females and *D. simulans* males. Male mating propensities versus success in hybridization. *Experientia.* 49:596-598.

- Jang, E. B.** 1995. Effects of mating and accessory gland injections on olfactory-mediated behavior in the female Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *J. Insect Physiol.* 41(8):705-710.
- Jang, E. B., Mcinnis, D. O., Lance, D. y Carvalho, L.** 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(1):139-144.
- Jang, E., McInnis, D. O., Kurashino, R. y Carvalho, L. A.** 1999. Behavioral switch of female Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: mating and oviposition activity in outdoor field cages in Hawaii. *Agric. For. Entomol.* 1(3):179-184.
- Janzen, F. J., y Stern, H. S.** 1998. Logistic regression for empirical studies of multivariate selection. *Evolution* 52(6):1564-1571.
- Kaneshiro, K. Y.** 1976. Ethological isolation and phylogeny in the *Planitibia* subgroup of Hawaiian *Drosophila*. *Evolution* 30:740-745.
- Kaneshiro, K. Y.** 2000. Sexual selection and speciation. En Aluja, M. y Norbom, A. L. *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior.* [Eds.] CRC Press. Washington DC. 780-783.
- Kaspi, R., Taylor, P. W. y Yuval, B.** 2000. Diet and size influence sexual advertisement and copulatory success of males in Mediterranean fruit fly leks. *Ecol. Entomol.* 25(3):279-284
- Kaspi, R. y Yuval, B.** 1999. Mediterranean fruit fly leks: factors affecting male location. *Funct. Ecol.* 13(4):539-545.
- Katiyar, K. P. y Ramirez, E. R.** 1970. Mating frequency and fertility of the Mediterranean fruit fly females alternately mated with normal and irradiated males. *J. Econ. Entomol.* 63:1247-1250.
- Katiyar, K. P. y Ramirez, E. R.** 1973. *Turrialba* 23:324-326.
- Kidwell, M. G.** 1979. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: the relationship between the P-M and I-R interaction systems. *Genet Res.* 33:205-217.
- Kidwell, M. G.** 1982. Intraespecific hybrid sterility. En Ashburner, M., Carson, H. L. y Thompson, J. N. Jr. [Eds]. *Genetics and Biology of Drosophila* 3c. Academic Press. 125-154.

- Liquido, N. J., Shinoda, L. A. y Cunningham, R. T.** 1990. Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 77:1-52.
- Lockhart, A. B., Thrall, P. H., y Antonovics, J.** 1996. Sexually transmitted diseases in animals: ecological and evolutionary implications. Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. 71:415-471.
- Louis, C. Savakis, C. y Kafatos, F. C.** 1987. Possibilities for genetic engineering in the eradication of harmful insects. En Economopoulos [Ed.] Actas del Segundo Simposio Internacional sobre la Mosca del Mediterráneo. Elsevier. 47-57.
- Loukeris, T. G., Livadaras, I., Arcà, B., Zabalou, S. y Savakis, C.** 1995. Gene transfer into the medfly *Ceratitidis capitata*. Science 270:2002-2005.
- Lozovskaya, E. R., Scheinker, V. S. y Evgen'ev, M. B.** 1990. A hybrid dysgenesis syndrome in *Drosophila virilis*. Genetics 126:619-623.
- Lux, S. A., Munyiri, F. N., Vilardi, J. C., Liedo, P. Economopoulos, A. Hasson, O., Quilici, S. Cayol, J. P., y Rendon, P.** Consistency in courtship pattern among populations of medfly (Diptera: Tephritidae): comparisons among wild strains and strains mass reared for SIT operations. Fla. Entomol. En prensa.
- Lux, S. A., Vilardi, J. C., Liedo, Gaggi, K. Calcagno, G. E., P., Munyiri, F. N., Vera, M. T. y Manso, F.** Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. Fla. Entomol. En prensa.
- Makela, M. E. y Richardson, R. H.** 1978. Hidden reproductively isolated populations: one of nature's countermeasures to genetic pest control. En Richardson, R. H. [Ed.] The Screworm Problem. Univ Texas Press.
- Malavasi, A., G.G.Rohwer, y D.S. Campbell.** 1994. Fruit fly free areas: strategies to develop them. En C.O. Calkins, W. Klassen, y P.Liedo [Eds]. Fruit flies and the sterile insect technique. CRC Press, Boca Raton, Fla. 165-180.
- Manso, F.C., y E. Lifschitz.** 1986. Chromosome polymorphism in a population of *Ceratitidis capitata*. En Actas del II Simposio Internacional de Moscas de la Fruta. 16-21 septiembre, Creta, Grecia.

- Liquido, N. J., Shimoda, L. A. y Cunningham, R. T.** 1990. Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 77:1-52.
- Lockhart, A. B., Thrall, P. H., y Antonovics, J.** 1996. Sexually transmitted diseases in animals: ecological and evolutionary implications. Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. 71:415-471.
- Louis, C. Savakis, C. y Kafatos, F. C.** 1987. Possibilities for genetic engineering in the eradication of harmful insects. En Economopoulos [Ed.] Actas del Segundo Simposio Internacional sobre la Mosca del Mediterráneo. Elsevier. 47-57.
- Loukeris, T. G., Livadaras, I., Arcà, B., Zabalou, S. y Savakis, C.** 1995. Gene transfer into the medfly *Ceratitidis capitata*. Science 270:2002-2005.
- Lozovskaya, E. R., Scheinker, V. S. y Evgen'ev, M. B.** 1990. A hybrid dysgenesis syndrome in *Drosophila virilis*. Genetics 126:619-623.
- Lux, S. A., Munyiri, F. N., Vilardi, J. C., Liedo, P. Economopoulos, A. Hasson, O., Quilici, S. Cayol, J. P., y Rendon, P.** Consistency in courtship pattern among populations of medfly (Diptera: Tephritidae): comparisons among wild strains and strains mass reared for SIT operations. Fla. Entomol. En prensa.
- Lux, S. A., Vilardi, J. C., Liedo, Gaggi, K. Calcagno, G. E., P., Munyiri, F. N., Vera, M. T. y Manso, F.** Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. Fla. Entomol. En prensa.
- Makela, M. E. y Richardson, R. H.** 1978. Hidden reproductively isolated populations: one of nature's countermeasures to genetic pest control. En Richardson, R. H. [Ed.] The Screworm Problem. Univ Texas Press.
- Malavasi, A., G.G.Rohwer, y D.S. Campbell.** 1994. Fruit fly free areas: strategies to develop them. En C.O. Calkins, W. Klassen, y P.Liedo [Eds]. Fruit flies and the sterile insect technique. CRC Press, Boca Raton, Fla. 165-180.
- Manso, F.C., y E. Lifschitz.** 1986. Chromosome polymorphism in a population of *Ceratitidis capitata*. En Actas del II Simposio Internacional de Moscas de la Fruta. 16-21 septiembre, Creta, Grecia.

- McInnis, D. O., Wong, T. T. Y., y Tam, S. Y. T.** 1986. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): suppression efficiencies of unisexual and bisexual sterilized release populations in field cages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79:931-937.
- McPheron, B.A y Steck, G. J.** [Eds.] 1996. Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management. St. Lucie Press. 586 pp.
- Merrel, D. J.** 1950. Measurement of sexual isolation and selective mating. *Evolution.* 4:326-331.
- Messing, H. R.** 1996. Status and Needs of Biological Control Research for Tephritid Flies. En Mc Pheron y Steck [Eds.] *Fruit Fly Pests. A World Assessment of their Biology and Management.* St. Lucie Press. 365-367.
- Metcalf, R. L. y Luckmann, W. H.** 1994. *Introduction to Insect Pest Management.* 3ra. Ed. Wiley.
- Michel, K., Stamenova, A., Pinkerton, A. C., Franz, G., Robinson, A. S., Gariou-Papalexiou, A., Zacharopoulou, A., O'Brotcha, D. A. y Atkinson, P. W.** 2001. Hermes-mediated germ-line transformation of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 10(2):155-162.
- Mitchell, W. C. y Saul, S. H.** 1990. Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, and their application in the USA. *Rev. Agr. Entomol.* 78:923-940.
- Miyatake, T., Chapman, T. y Partridge, L.** 1999. Mating-Induced inhibition of remating in female Mediterranean fruit flies *Ceratitidis capitata*. *J. Insect Physiol.* 45(11):1021-1028.
- Moreno, D. S. y Mangan, R. L.** 2000. Novel insecticide Strategies such as Phototoxic Dyes in Adult Fruit Fly Control and Suppression Programmes. En Tan, K-H. [Ed.] *Area-wide control of fruit flies and other insect pests.* Penerbit Universiti Sains Malaysia Press, Malasia. 421-432.
- Müller, H. J.** 1942. Isolation mechanisms, evolution and temperature. *Biol. Symp.* 6:71-125.
- Nakagawa, S. Farias, G. J., Suda, D., Cunningham, R. T. y Chambers, D. L.** 1971. Reproduction of the Mediterranean Fruit Fly: Frequency of mating in the laboratory. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64(4):949-950.

- McInnis, D. O., Wong, T. T. Y., y Tam, S. Y. T.** 1986. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): suppression efficiencies of unisexual and bisexual sterilized release populations in field cages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79:931-937.
- McPheron, B.A y Steck, G. J.** [Eds.] 1996. Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management. St. Lucie Press. 586 pp.
- Merrel, D. J.** 1950. Measurement of sexual isolation and selective mating. *Evolution.* 4:326-331.
- Messing, H. R.** 1996. Status and Needs of Biological Control Research for Tephritid Flies. En Mc Pheron y Steck [Eds.] *Fruit Fly Pests. A World Assessment of their Biology and Management.* St. Lucie Press. 365-367.
- Metcalf, R. L. y Luckmann, W. H.** 1994. *Introduction to Insect Pest Management.* 3ra. Ed. Wiley.
- Michel, K., Stamenova, A., Pinkerton, A. C., Franz, G., Robinson, A. S., Gariou-Papalexiou, A., Zacharopoulou, A., O'Brotcha, D. A. y Atkinson, P. W.** 2001. Hermes-mediated germ-line transformation of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 10(2):155-162.
- Mitchell, W. C. y Saul, S. H.** 1990. Current control methods for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, and their application in the USA. *Rev. Agr. Entomol.* 78:923-940.
- Miyatake, T., Chapman, T. y Partridge, L.** 1999. Mating-Induced inhibition of remating in female Mediterranean fruit flies *Ceratitidis capitata*. *J. Insect Physiol.* 45(11):1021-1028.
- Moreno, D. S. y Mangan, R. L.** 2000. Novel insecticide Strategies such as Phototoxic Dyes in Adult Fruit Fly Control and Suppression Programmes. En Tan, K-H. [Ed.] *Area-wide control of fruit flies and other insect pests.* Penerbit Universiti Sains Malaysia Press, Malasia. 421-432.
- Müller, H. J.** 1942. Isolation mechanisms, evolution and temperature. *Biol. Symp.* 6:71-125.
- Nakagawa, S. Farias, G. J., Suda, D., Cunningham, R. T. y Chambers, D. L.** 1971. Reproduction of the Mediterranean Fruit Fly: Frequency of mating in the laboratory. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64(4):949-950.

- Newport, M. E. A., y Gromko, M. H.** 1984. The effect of experimental design on female receptivity to remating and its impact on reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 38:1261-1272.
- Norry, F. M., Calcagno, G., Vera, M. T., Manso, F., y Vilardi, J. C.** 1999. Sexual selection on male morphology independent of male-male competition in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92:571-577.
- Nuñez-Bueno, L.** 1987. La mosca del Mediterráneo. ICA-Infoma. E-F-M: 9-15.
- O'Brotcha, D. A. y Atkinson, P. W.** 1996. Transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26:739-753.
- O'Brotcha, D. A. y Handler, A. M.** 1988. Mobility of *P* elements in drosophilids and non-drosophilids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:6052-6056.
- O'Hara, E., Pruzan, A. y Ehrman, L.** 1976. Ethological isolation and mating experience in *Drosophila paulistorum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(3):975-976
- Parker, G. A.** 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.* 45:525-567.
- Parker, G. A.** 1998. Sperm competition and the evolution of ejaculates: towards a theory based. En Birkhead, T. R. y Møller, A. P. [Eds.] *Sperm Competition and Sexual Selection.* 3-54.
- Parker, G. A. y Partridge, L.** 1998. Sexual conflict and speciation. *Phil. Trans. R. Soc. London B.* 353(1366) 261-274.
- Partridge, L.; Ewing, A. y Chandler, A.** 1987. Male size success in *Drosophila melanogaster*: the roles of male and female behaviour. *Anim. Behav.* 35:55-562.
- Partridge, L. y Halliday, T.** 1984. Mating Patterns and mate Choice. En Krebs, J. R. y Davies, N. B. [Eds.] *Behavioural Ecology.* Blackwell Scientific Publications. 222-250.
- Piccolo, M. I., Wood, E., de Licastro, S. A. y Zebra, E.** 1994. Control químico y resistencia a insecticidas. En Quesada-Allué [Ed.] *La mosca Mediterránea.* Publicación del Laboratorio de Bioquímica del Desarrollo, Instituto Campomar, Bs. As. Argentina. 65-68.

- Plasterk, R. H. A., Izsvák, Z. E Ivics, Z.** 1999. Resident aliens, the Tc1/*mariner* superfamily of transposable elements. *Trends in Genetics*. 15(8):326-332.
- Prokopy, R. J. y Hendrichs, J.** 1979. Mating Behavior of *Ceratitits capitata* on a field-cage host tree. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72:642-648.
- Pyle, D. W. y Gromko, M. H.** 1978. Repeated mating by female *Drosophila melanogaster*: the adaptative importance. *Experimentia* 34:449-450.
- Quesada-Allué, L.; Rabossi, A. y Wappner, P.** 1994. Introducción a *Ceratitits capitata* y cría en el laboratorio. En Quesada-Allué [Ed.] *La Mosca Mediterránea*. Publicación del Laboratorio de Bioquímica del Desarrollo, Instituto Campomar, Bs. As. Argentina. 15-31.
- Rendon, P.** 1996. Development and evaluation of a temperature sensite lethal (*tsl*) genetic sexing strain of the Mediterranean fruit fly *Ceratitits capitata* (Wied.) Tesis de Doctorado Universidad de Manchester, Reino Unido.
- Rendon, P, McInnis, D.O. Lance, D.L. y Stewart. J.** 2000. Comparison of medfly male-only and bisex releases in large-scale field trials. En Tan, K-H. [Ed.] *Area-wide control of fruit flies and other insect pests*. Penerbit Universiti Sains Malaysia Press, Malasia. 517-525.
- Richardson, R. H.** [Ed]. 1978. *The screw-worm problem*. University of Texas Press, Austin.
- Ridley, M.** 1988. Mating frequency and fecundity in insects. *Biol. Rev.* 63:509-549.
- Ridley, M.** 1989. The timing and frequency of mating in insects. *Anim. Behav.* 37:535-545.
- Ringo, J.** 1996. Sexual receptivity in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 41:473-494.
- Robertson, H. M. y Lampe, D. J.** 1995. Distribution of transposable elements in arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 40:333-357.
- Robertson, H. M. y MacLeod, E. G.** 1993. Five major subfamilies of *mariner* transposable elements in insects, including the Mediterranean fruitfly, and related arthropods. *Insect Mol. Biol.* 2:125-139.
- Robinson, A. S., Cirio, U., Hooper, G. H. S. y Capparella, M.** 1986. Field cage studies with a genetic sexing strain in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitits capitata*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72:642-648.

- Robinson, A. S., Franz, G. y Fisher, K.** 1999. Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: Development, Mass Rearing and Field Application. Trends in Entomol. 81-104.
- Robinson, A. S. y Hooper, G.** 1989a. Fruit flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, V3A. Elsevier 372 pp.
- Robinson, A. S. y Hooper, G.** 1989b. Fruit flies; their biology, natural enemies and control. World Crop Pests, V3B. Elsevier 447 pp.
- Robinson, A. S., Savakis, C. y Louis, C.** 1988. The status of molecular genetic studies in the medfly *Ceratitis capitata* in relation to genetic sexing. En Modern Insect Control: Nuclear Technique and Biology. International Atomic Energy Agency, Viena, Austria. 241-250.
- Robinson, T., Johnson, N. A. y Wade, M. J.** 1994. Postcopulatory, prezygotic isolation: intra-specific and interspecific sperm precedence in *Tribolium* spp., flour beetles. Heredity 73:155-159.
- Roderick, G. K.** 1996. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. Annu. Rev. Entomol. 41:325-352.
- Rössler, Y.** 1979. The Genetics of the Mediterranean Fruit Fly: a "White Pupae" Mutant. Ann. Entomol. Soc. Am. 72:583-585.
- Roush, R. T., y Hopper, K. R.** 1995. Use of single family lines to preserve genetic variation in laboratory colonies. Ann. Entomol. Soc. Am. 88:713-717.
- Rowe, L.** 1994. The cost of mating and mate choice in water striders. Anim. Behav. 48:1049-1056.
- Rubin, G. M. y Spradling, A. C.** 1983. Vectors for P element mediated gene transfer in *Drosophila*. Nucleic Acid Res. 11:6341-6351.
- Rundle, H. D., Mooers, A., Whitlock, M. C.** 1998. Single founder-flush events and the evolution of reproductive isolation. Evolution. 52(6): 1850-1855.
- Saul, S. H. y McCombs, S. D.** 1993a. Dynamics of sperm use in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): reproductive fitness of multiple-mated females and sequentially mated males. Ann. Entomol. Soc. Am. 86(2):198-202.
- Saul, S. H. y McCombs, S. D.** 1993b. Increased remating frequency in sex ratio distorted lines of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 86(5):631-637.

- Saul, S. H., Tam, S. Y. T. y Mcinnis, D. O.** 1988. Relationship between sperm competition and copulation duration in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81:498-502.
- Schaefer, R. E. Kidwell, M. G. y Fausto-Sterling, A.** 1979. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: morphological and cytological studies of ovarian dysgenesis. *Genetica* 92:1141-1152.
- Scheinker, V. S., Lozovskaya, E. R., Bishop, J. G., Corces, V. G. y Evgen'ev, M. B.** 1990. A long terminal repeat-containing retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* 274:765-768.
- Selivon, D., Perondini, L. P. y Morgante, J. S.** 1999. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae). *Gen. Mol. Biol.* 22(4):507-510.
- Seo, S. T.; Vargas, R. I.; Gilmore, J. E.; Kurashima, R. S. y Fujimoto, M. S.** 1990. Sperm transfer in normal and gamma-irradiated, laboratory-reared Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 83(5):1949-1953.
- Sgro, C. M., Chapinan, T. y Partridge, L.** 1998. Sex-specific selection on time to remate in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 56:1267-1278.
- Shelly, T. E.** 1999. Trimedlure and the mating competitiveness of irradiated male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.* 28(5):780-786.
- Shely, T. E.** 2000. Male signalling and lek attractiveness in the Mediterranean fruit fly. *Anim. Behav.* 60(2):245-251.
- Shely, T. E.** 2001. Exposure to alfa-Copaene and alfa-Copaene Oils enhances mating success of male Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94(3):497-502.
- Sheppard, W. S., Steck, G. J. y McPherson, B. A.** 1992. Geographic populations of the medfly may be differentiated by mitochondrial DNA variation. *Experientia* 48:1010-1013.
- Shoukry, A. y Hafez, M.** 1979 Studies of the biology of the Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. Appl.* 26, 33-39.
- Simmons, L. W. y Siva-Jothy, M. T.** 1998. Sperm Competition in Insects: Mechanisms and the Potential for Selection. En Parker [Ed.] *Sperm Competition and Sexual Selection*. Academic Press. 341-434.

- Snook, R. R.** 2001. Sexual selection: Conflict, kindness and chicanery. *Current Biol.* 11:337-341.
- Spinoglio, E. Manso, F. C. y Cladera, J. L.** 1997. Atrofia femenina unidireccional en un cruzamiento entre cepas de *Ceratitidis capitata*. Actas del XXVIII Congreso Argentino de Genética. 14-18 de septiembre, San Miguel de Tucumán, Argentina.
- Stalker, H. D.** 1942. Sexual isolation studies in the species complex *Drosophila virilis*. *Genetics* 27:238-257.
- StatSoft, Inc.** 2000. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa OK, USA.
- Stutervant, A. H.** 1939. High mutation frequency induced by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 25: 308-310.
- Sved, J.** 1976. Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: a posible explanation in terms of spatial organization of chromosomes. *Aust. J. Biol. Sci.* 29:375-388.
- Tan, K-H.** 2000. Area-wide control of fruit flies and other insect pests. Penerbit Universiti Sains Malaysia Press, Malasia. 782 pp.
- Tanada y Kaya.** 1997. *Insect Pathology*. Academic Press, California. 666 pp.
- Taylor, D. B., y Craig, G. B.** 1985. Unidirectional reproductive incompatibility between *Aedes (Protomacleaya) brelandi* and *A. (P.) hendersoni* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78:769-774.
- Taylor, P. W., Bear, A., Gazit, Y. y Rössler, Y.** 2001a. Sexual competitiveness of Vienna 4/Tol-94 'Genetic Sexing' sterile Mediterranean fruit fly males in Israel. *Phytoparasitica* 29(1):7-14.
- Taylor, P. W., Kaspi, R., Mossinson, S. y Yuval, B.** 2001b. Age-dependent insemination success of sterile Mediterranean fruit flies. *Entomol. Exp. Appl.* 98: 27-33.
- Taylor, P. W., Kaspi, R. y Yuval, B.** 2000. Copula duration and sperm storage in Mediterranean fruit flies from a wild population. *Physiol. Entomol.* 25:94-99.
- Taylor, P. W., y Yuval, B.** 1999. Postcopulatory sexual selection in Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Tephritidae): advantages for large and protein-fed males. *Anim. Behav.* 58:247-254.
- Teráu, H.** 1977. Comportamiento alimentario y su correlación a la reproducción en hembras de *Ceratitidis capitata* Wied. *Revista Agronómica N.O.A.* 14:17-34.

- Thornhill, R. y Alcock, J.** 1983. The Evolution of Insect Mating Systems. Harvard University Press, Cambridge, MA. 128-140.
- Torti, C., Gomulski, L. M., Malacrida, A. R., Capy, P. y Gasperi, G.** 1997. Genetic and molecular investigations on the endogenous mobile elements of non-drosophilid fruitflies. *Genetica* 100:119-129.
- Torti, C., Gomulski, L. M., Moralli, D., Rainondi, E., Robertson, H. M., Capy, P., Gasperi, G. y Malacrida, A. R.** 2000. Evolution of different subfamilies of *mariner* elements within the medfly genome inferred from abundance and chromosomal distribution. *Genome*. 108:523-532.
- Torti, C., Malacrida, A. R., Yannopoulos, G., Louis, C. y Gasperi, G.** 1994. Hybrid dysgenesis-like phenomena in the Medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Heredity* 85:92-99.
- Tregenza, T., y Wedell, N.** 1998. Benefits of multiple mates in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Evolution* 52:1726-1730.
- Trivers, R. L.** 1972. Parental Investment and sexual selection. En: Campbell, B. [Ed.] *Sexual Selection and the Descent of Man*. Aldine Press, Chicago. Cap 10.
- Vehrencamp, S. L. y Bradbury, J. W.** 1984. Mating Systems and Ecology. En Krebs, J. R. y Davies, N. B. [Eds.] *Behavioural Ecology*. Blackwell Scientific Publications. 251-278.
- Vera, M. T., Rodriguez, R., Segura, D. F. y Cladera, J. L.** 2000. Assessing areas of climatic stress for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Argentina. *Actas del XXI Congreso Internacional de Entomología*. Foz do Iguazu Brasil, Agosto de 2000.
- Vergani, A. R.** 1952. La mosca del Mediterraneo. *Publ. Instituto San. Serie B N°22* 3-17.
- Werren, J. H.** 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.* 42:587-609.
- WGFFWH. Meeting of the Working Group on Fruit Flies of the Western Hemisphere.** 2001. Sesión III: Control / Eradication Methods. *Actas del Congreso del Grupo de Trabajo en Moscas de la Fruta del Hemisferio Occidental*. 25-30 Noviembre, Mendoza, Argentina.
- White, I. M.** 1989. The state of fruit fly taxonomy and future research priorities. En *Cavallero, R.* [Ed.] *Fruiti Flies of Economic Importance* 87. *Actas del Simposio*

- Internacional del CEC/IOBC. Roma 7-10 Abril 1987. Balkema Róterdam. 543-552.
- White, I. M. y Elson-Harris, M. M.** 1994. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. Oxford, UK: CAB International, in association with ACIAR. 601 pp.
- Whitten, M. J.** 1969. Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects. *J. Econ. Entomol.* 62:272-273.
- Whittier, T. S. y Kaneshiro, K. Y.** 1995. Intersexual Selection in the Mediterranean fruit fly: does female choice enhance fitness?. *Evolution* 49:990-996.
- Whittier, T. S. y Shelly, T. E.** 1993. Productivity of singly vs. multiply mated female Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Kan. Entomol. Soc.* 66(2):200-209.
- Williamson, D. L.** 1989. Oogenesis and Spermatogenesis. En Robinson, A. y Hooper, G. [Eds.] *Fruit Flies. Their Biology, Natural Enemies and Control V3A.* Elsevier.141-151.
- Wu, C., y Davis, A. W.** 1993. Evolution of postmating reproductive isolation: the composite nature of Haldane's rule and its genetic bases. *Am. Nat.* 142:187-212.
- Wu, C., Hollocher, H., Begun, D. J., Aquadros, C. F., Xu, Y. y Wu, M.** 1995. Sexual isolation in *Drosophila melanogaster*: A posible case of incipient speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:2519-2523.
- Xue, L., y Noll, M.** 2000. *Drosophila* female sexual behavior induced by sterile males showing copulation complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3272-3275.
- Yannopoulos, G., Stamatis, N., Monastirioti, M., Hatsopoulos, P. y Louis, C.** 1987. *Hobo* is responsible for the induction of hybrid dysgenesis by strains of *Drosophila melanogaster* bearing the male recombination factor 23.5MRF. *Cell* 49:487-495.
- Yasui, Y.** 1997. A 'Good sperm' model can explain the evolution of costly multiple mating by females. *Am. Nat.* 149:573-584.
- Yasui, Y.** 1998. The 'genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *TREE* 13:246-250.
- Yuval, B., Blay, S y Kaspi, R.** 1996. Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89(3):486-492.

- Yuval, B. y Hendrichs, J.** 2000. Behavior of flies in the genus *Ceratitis* (Dacinae: Ceratidini). En Aluja, M. y Norbom, A. L. Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of behavior. [Eds.] CRC Press. Washington DC. 429-457.
- Yuval, B., Kaspi, R., Shloush, S. y Warburg, M. S.** 1998. Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecol. Entomol.* 23(2):211-215.
- Zapien, G., Hendrichs, J., Liedo, P., y Cisneros, A.** 1983. Comparative mating behavior of wild and mass reared medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) on a field cage host tree. II. Female mate choice. En Cavalloro [Ed.] Fruit flies of economic importance. Balkema, The Netherlands. 397-409.
- Zar, J. H.** 1996. *Bioestatistical Analysis*. 3rd ed. Prentice-Hall, New Jersey. 662 pp.
- Zeh, J. A. y Zeh, D. W.** 1996. The evolution of polyandry I: Intragenomic conflict and genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 263:1711-1717.
- Zeh, J. A. y Zeh, D. W.** 2001. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. *Anim. Behav.* 61(6):1051-1063.
- Zouros, E.** 1981. The chromosomal basis of sexual isolation in two sibling species of *Drosophila*: *D. arizonensis* and *D. mojavensis*. *Genetics.* 97:703-718.