

Tesis Doctoral

Factores que afectan el éxito de apareamiento de machos de la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Bachmann, Guillermo Enrique

2016

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:

Bachmann, Guillermo Enrique. (2016). Factores que afectan el éxito de apareamiento de machos de la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5936_Bachmann

Cita tipo Chicago:

Bachmann, Guillermo Enrique. "Factores que afectan el éxito de apareamiento de machos de la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5936_Bachmann

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Factores que afectan el éxito de apareamiento de machos de la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Guillermo Enrique Bachmann

Director de tesis: Dr. Diego F. Segura

Director Asistente: Dra. Patricia C. Fernández

Consejero de Estudios: Dr. Javier López de Casenave

Lugar de trabajo: Instituto de Genética "Ewald A. Favret", INTA Castelar

Buenos Aires, 22 de Marzo de 2016

Factores que afectan el éxito de apareamiento de machos de la Mosca Sudamericana de la Fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Resumen

Antecedentes. Los compuestos químicos (o metabolitos secundarios) presentes en plantas pueden afectar las estrategias reproductivas de moscas tefritidas, por ejemplo influyendo en la comunicación química entre sexos y en la elección de pareja para el apareamiento.

Objetivos y Metodología. Esta tesis se basa en la exploración de factores que afectan el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus* y en el estudio de los mecanismos asociados. En particular se investigó si tratamiento con volátiles de frutos de guayaba o con metopreno (un análogo de la hormona juvenil en insectos) provoca en los machos una mayor aceptación por parte de las hembras. Ya que los mecanismos asociados a este fenómeno de selección sexual pueden estar ligados a la comunicación química, visual y acústica entre sexos, se analizaron los perfiles químicos y el comportamiento de llamado sexual de los machos tratados con estos compuestos. Por último, mediante la estimación de variables de fecundidad y fertilidad se evaluó el valor reproductivo asociado a este evento de selección.

Resultados. La exposición a volátiles de guayaba incrementó el éxito de apareamiento de los machos y afectó positivamente la liberación de feromonas sexuales y su comportamiento de llamado sexual involucrados en el cortejo. Este tratamiento con volátiles parece haber aumentado principalmente la actividad locomotora de los machos, y este podría ser el mecanismo por el cual se liberó más feromona, lo que desencadenó la preferencia de las hembras por aquellos machos previamente expuestos. No se evidenciaron diferencias cualitativas en los volátiles emitidos y en los compuestos cuticulares entre machos expuestos a guayaba y machos no expuestos. Las hembras apareadas con machos expuestos a guayaba mostraron un incremento significativo en su fecundidad. El tratamiento con metopreno también incrementó el éxito de apareamiento de los machos, sin embargo el mecanismo parece estar más relacionado con un aumento en la producción de feromona, independientemente de la actividad locomotora. En este caso, no se pudieron evidenciar beneficios directos de la preferencia de la hembra, ya que la fecundidad y la fertilidad fueron similares entre hembras apareadas con machos tratados y no tratados con metopreno.

Conclusiones. La exposición a volátiles de guayaba y el tratamiento con metopreno parecen influenciar el éxito de apareamiento de los machos a través de un mejoramiento de señales químicas y/o físicas relacionadas con la comunicación entre sexos. La preferencia de las

hembras por machos expuestos a guayaba podría estar explicada, al menos en parte, por un beneficio en términos de una mayor fecundidad; mientras que la preferencia de las hembras por machos tratados con metopreno podría estar más relacionada a la obtención de un beneficio indirecto. Los resultados de esta tesis tienen importantes implicancias para el manejo de esta especie plaga a través del uso de la Técnica del Insecto Estéril.

Palabras clave: *Anastrepha fraterculus*, feromonas, mejoramiento sexual, competitividad de apareamiento, guayaba, volátiles de fruta, metopreno, hormona juvenil, fecundidad, fertilidad, selección sexual.

Factors affecting male mating success in South America fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)

Abstract

Background. Chemical compounds of plants (or secondary metabolites) can affect the reproductive strategies of Tephritidae fruit flies, for instance affecting the chemical communication between sexes and the choice of a mating partner.

Objectives and methodology. This thesis is based on the exploration of factors that affect *A. fraterculus* male's behavior and the study of the associated mechanisms. Particularly it was investigated if the exposure of males to guava fruit volatiles or a juvenile hormone analogue (methoprene) could cause a greater acceptance by females. Since the associated mechanisms to this phenomenon of sexual selection can be linked to chemical, visual and acoustic communication, chemical and behavioral profiles of males treated with these compounds were compared to that on non-treated males. Finally, by estimating fecundity and fertility in females mated with the two types of males, the reproductive value associated with this selection process was evaluated.

Results. The exposure to guava volatiles increases male's mating success and positively affected the sex pheromone release rate and their rate of sexual displays. The exposure to volatiles seems to have increased the males' locomotor activity, and this could be the mechanism by which more pheromone was liberated, triggering the female preference for previously exposed males. There were no qualitative differences in the pheromonal blend and the cuticular extracts of exposed and non-exposed males. Females that mated with guava exposed males showed higher fecundity than females that mated with non-exposed males. Methoprene treatment also increased male's mating success, however the mechanism seems to be related to an increase in pheromone production, regardless of locomotor activity. In this case, females that mated with treated and non-treated males did not show differences in their fecundity and fertility.

Conclusions. The exposure to guava fruit volatiles and the methoprene treatment appear to influence male's mating success through improved chemical and/or physical signs related to communication between sexes. Female preference for guava exposed males could be explained, at least in part, by a direct benefit in terms of fecundity, whereas the preference for methoprene treated males seems to be related to indirect benefits. The results of this thesis

have important implications for the management of this pest species through the use of the Sterile Insect Technique.

Keywords: *Anastrepha fraterculus*, pheromone, sexual enhancement, mating competitiveness, guava, fruit volatiles, methoprene, juvenile hormone, fecundity, fertility, sexual selection.

Agradecimientos

A mi director de tesis, Diego Segura, quién me guió en todo momento en este largo y complejo camino del aprendizaje. Cuando necesité ayuda en la parte experimental y sobre todo en la intelectual siempre estuvo presente para trabajar a mi lado, desde mucho antes de comenzar el primer bosquejo del plan de estudios hasta el último minuto de la redacción de esta tesis. Realmente admiro su capacidad para lograr (y ayudarme a lograr) los objetivos y a su vez destaco su calidad de persona. Fue un honor para mí ser su estudiante.

A mi codirectora, Patricia Fernández (Pato), quién supo apoyarme en la parte “más química” de mis estudios. Al igual que Diego me ayudó enormemente en los aspectos laborales e intelectuales y con su optimismo y nuevas ideas logró levantar los ánimos en muchas ocasiones.

A Teresa Vera por ser una directora más en todos estos años, aportando gran ayuda en los interminables ensayos y en la elaboración de ideas, análisis de datos y redacción. También por haberme ofrecido alojamiento en su casa en Tucumán en varias oportunidades durante mis investigaciones y por haberme brindado la posibilidad de viajar a Praga y a Viena en donde pude adquirir nuevos conocimientos y conocer nuevos grupos de trabajo de distintas disciplinas de la biología y la química.

A todos mis compañeros y amigos del gran grupo “Moscas” que en algún momento me dieron una mano en los experimentos y me dejaron buenos recuerdos: Alita, Ana, Ale S, Ceci, Clari, Claudia, Costi, Diego, Faby, Fran, Germán, Irina, Jorge, Lida, Marianela, Pato P, Romi y Silvia. Mil gracias a todos ellos!

Quisiera agradecer especialmente a Fran, por haber dedicado gran parte de su tiempo a ayudarme con mis experimentos, salidas en mini campañas de recolección de frutas (con o sin larvas) y capturas de moscas en el predio de INTA y sobre todo por los buenos momentos vividos durante este tiempo; también a Clara por ayudarme con los rebuscados análisis multivariados; a Ana que se incorporó al grupo hace no mucho tiempo y que desde el primer momento se ofreció en ayudarme en lo que necesitara; a Faby y a Germán por los preparados de material para los ensayos y a Jorge, nuestro director de grupo, por siempre atender y aportar a la buena relación dentro del grupo y por estar dispuesto a revisiones de informes con sus valiosos aportes.

A Lau, Jose y a todos los integrantes del grupo de trabajo de Tere Vera en Tucumán que me brindaron gran ayuda tanto en los ensayos como en la captura de insectos, recolección y envío de guayabas año tras año.

A Blanka Kalinová por abrirme las puertas de su laboratorio en Praga y enseñarme y facilitarme el uso de los sofisticados equipos cromatográficos y electroantegráficos que fueron herramientas importantes para mis estudios y formación.

A Radka Břízová que fue quien más me ayudó con los análisis cromatográficos en dos dimensiones, tanto en Praga como en Bs. As; y a Jarmila Titzenthalerová y a Michal Hoskovec por sus colaboraciones en los experimentos en Praga.

A Peter E.A. Teal, a quien tuve el honor de conocer personalmente y entender por qué se lo reconoció como un gran maestro y un investigador excepcional, no solamente por su conocimiento sino también por el entusiasmo que lograba transmitir haciendo que nada parezca imposible.

A mi consejero de estudios, Javier López de Casenave, por su buena onda y excelentes cursos.

Agradezco al CONICET, por haberme otorgado las becas Tipo I y II y a la financiación de mis actividades en el laboratorio a través de diversos proyectos (PICT y PIP).

Al INTA y al IGEAF que me ofrecieron la infraestructura y que junto con sus recursos humanos posibilitaron el desarrollo de la mayor parte de mis actividades de esta tesis.

A mi abuela, tías, primos y amigos de la vida, por estar.

Y sobre todo, a mis viejos Jenny y Jorge por apoyarme, escucharme, aguantarme y alentarme en todo momento. Y por hacerme la persona que soy. A ellos les dedico esta tesis. ¡Gracias!

Índice.

Resumen.....	I
Abstract.....	III
Agradecimientos.....	V
Capítulo 1. Introducción general, objetivos e hipótesis.....	1
1.1. Introducción general.....	2
1.2. Objetivos.....	10
1.3. Hipótesis.....	11
1.4. Referencias.....	12
Capítulo 2. Efecto de la exposición a volátiles de frutos de guayaba sobre el comportamiento de llamado sexual y la emisión de feromona en machos de <i>Anastrepha fraterculus</i>.....	17
2.1. Introducción.....	18
2.1.1. Objetivos.....	20
2.2. Materiales y métodos.....	20
2.2.1. Material biológico.....	20
2.2.2. Efecto de la exposición a volátiles de frutos de guayaba sobre el éxito de apareamiento, el comportamiento de llamado sexual y la liberación de feromonas de los machos.....	21
2.2.2.1. Experimento 1. Éxito de apareamiento.....	22
2.2.2.2. Experimento 2: Comportamiento de llamado y liberación de feromona.....	24
2.2.3. Experimento 3. Efecto de una mezcla artificial de compuestos volátiles sobre el éxito de apareamiento de los machos.....	27
2.2.4. Análisis de datos.....	29
2.3. Resultados.....	29
2.3.1. Experimento 1. Éxito de apareamiento.....	29
2.3.2. Experimento 2. Comportamiento de llamado y liberación de feromona.....	31
2.3.3. Experimento 3. Efecto de una mezcla artificial de compuestos volátiles sobre el éxito de apareamiento de los machos.....	33
2.4. Discusión.....	34
2.5. Referencias.....	37
Capítulo 3. Caracterización química y sensorial de perfiles químicos de machos de <i>Anastrepha fraterculus</i> expuestos a compuestos volátiles del fruto de guayaba.....	40
3.1. Introducción.....	41
3.1.1. Objetivos.....	44
3.2. Materiales y métodos.....	44
3.2.1. Material biológico.....	44

3.2.2. Obtención de muestras.....	44
3.2.3. Colecta de volátiles.....	45
3.2.4. Lavado de machos.....	45
3.2.5. Análisis cromatográfico de los volátiles y de los compuestos en cutícula mediante GCxGC/TOF-MS.....	46
3.2.6. Electroantenografía (EAG).....	50
3.2.7. Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección (GC-EAD).....	51
3.2.8. Análisis de datos.....	53
3.3. Resultados.....	53
3.3.1. Comparación de volátiles de los machos.....	53
3.3.1.1. Análisis por CGxGC/TOF-MS de los volátiles: comparación visual.....	53
3.3.1.2. Análisis por CGxGC/TOF-MS de los volátiles: comparación cualitativa y cuantitativa de los compuestos estudiados.....	55
3.3.1.3. Análisis multivariado de los compuestos estudiados.....	56
3.3.1.4. Electroantenografía de volátiles de machos.....	56
3.3.1.5. Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección para volátiles de machos.....	57
3.3.2. Comparación de compuestos de cutícula de los machos.....	59
3.3.2.1 Análisis por CGxGC/TOF-MS de los lavados cuticulares: comparación visual.....	59
3.3.2.2. Análisis por CGxGC/TOF-MS de los lavados cuticulares: comparación cualitativa y cuantitativa de los compuestos estudiados.....	61
3.3.2.3. Análisis multivariado de los compuestos estudiados.....	62
3.3.2.4. Electroantenografía de compuestos de cutícula de los machos.....	62
3.3.2.5. Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección para compuestos de cutícula de los machos.....	63
3.4. Discusión.....	65
3.5. Referencias.....	70

Capítulo 4. Efecto del tratamiento con metopreno sobre el desempeño sexual en machos de <i>Anastrepha fraterculus</i>.....	74
4.1. Introducción.....	75
4.1.1. Objetivos.....	79
4.2. Materiales y métodos.....	80
4.2.1. Material biológico.....	80
4.2.2. Éxito de apareamiento de machos.....	80
4.2.3. Experimento 1. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 10-12 días post-emergencia.....	80
4.2.4. Experimento 2. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 18-22 días post-mergencia.....	81
4.2.5. Experimento 3. Efecto de perfumado del metopreno.....	81
4.2.6. Experimento 4. Comportamiento de llamado sexual y emisión de feromonas por parte de los machos.....	82
4.2.7. Análisis de datos.....	82
4.3. Resultados.....	83

4.3.1. Experimento 1. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 10-12 días post-emergencia.....	83
4.3.2. Experimento 2. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 18-22 días post-emergencia.....	85
4.3.4. Experimento 3. Efecto de perfumado del metopreno.....	86
4.3.5. Experimento 4. Comportamiento de llamado sexual y emisión de feromonas por parte de los machos.....	87
4.4. Discusión.....	89
4.5. Referencias.....	93

Capítulo 5. Beneficios directos asociados a la preferencia por machos expuestos a guayaba o tratados con metopreno por parte de las hembras de <i>Anastrepha fraterculus</i>.....	96
5.1. Introducción.....	97
5.1.1. Objetivos.....	103
5.2. Materiales y Métodos.....	104
5.2.1. EXPERIMENTO 1. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos expuestos a volátiles de guayaba.....	104
5.2.2. EXPERIMENTO 2. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos tratados con metopreno.....	106
5.2.3. EXPERIMENTO 3. Fecundidad y fertilidad de hembras tratadas con metopreno.....	107
5.2.4. Análisis de datos.....	108
5.3. Resultados.....	108
5.3.1. Experimento 1. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos expuestos a volátiles de guayaba.....	108
5.3.2. EXPERIMENTO 2. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos tratados con metopreno.....	111
5.3.3. EXPERIMENTO 3. Fecundidad y fertilidad de hembras tratadas con metopreno.....	114
5.4. Discusión.....	116
5.5. Referencias.....	121

Capítulo 6. Conclusiones finales.....	126
Referencias.....	129

Capítulo 1

Introducción general, objetivos e hipótesis

1.1. Introducción general

Comunicación química en insectos

Los infoquímicos (o semioquímicos) son cualquier clase de compuesto químico involucrado en la comunicación entre organismos vivos. Son emitidos por un individuo y percibidos por otro en el cual desencadena una respuesta fisiológica y/o comportamental. Los infoquímicos pueden actuar de manera interespecífica (aleloquímicos) o intraespecífica (feromonas). Los aleloquímicos se dividen en tres subcategorías: las kairomonas (que benefician solamente al receptor), las alomonas (que benefician únicamente al emisor) y las sinomonas (que benefician tanto al emisor como al receptor). Las feromonas fueron definidas originalmente como sustancias que son secretadas por fuera del cuerpo de un individuo y recibidas por otro de su misma especie desencadenando una reacción específica como un comportamiento definido o un proceso de desarrollo (Karlson y Lüscher 1959). Estas pueden dividirse en dos subcategorías: 1) feromonas de liberación, que producen una respuesta inmediata en el receptor (por ejemplo, el macho de una polilla que se orienta hacia las hembras que liberan feromonas sexuales) y 2) feromonas de iniciación, las que desencadenan la iniciación de una respuesta fisiológica que no es inmediatamente observable (Tumlinson y Teal 1987). Las feromonas de liberación tienen diversos usos entre los insectos. Entre ellas se puede mencionar a las feromonas de agregación que ayudan a los individuos a congregarse en determinados sitios con el fin de desencadenar diversos tipos de comportamientos en un contexto social, y las feromonas sexuales que son emitidas por un organismo en un contexto de apareamiento y que provoca una respuesta sexual en un miembro del sexo opuesto (Landolt y Phillips 1997). Las feromonas sexuales pueden ser clasificadas como 1) feromonas sexuales de atracción, que desencadenan la orientación del desplazamiento en contra del viento o 2) feromonas sexuales de cortejo, provocando gran variedad de respuestas de corto alcance (Landolt y Phillips 1997). Las feromonas sexuales pueden, por lo tanto actuar a cortas distancias desencadenando, induciendo cambios fisiológicos asociados con el apareamiento (Vaničková 2012).

Selección sexual

Según el concepto de selección sexual, en una determinada especie con reproducción sexual el sexo que más esfuerzo biológico invierte en el desarrollo de su progenie (inversión de recursos energéticos y cuidado parental) (Trivers 1972) es el que elige a su pareja. En la mayoría de las especies la inversión parental suele ser mayor en hembras ya que son las que desarrollan

gametas más grandes, con mayores reservas y suelen dedicar mayor cuidado parental que los machos. Esto se traduce en una tasa potencial de reproducción menor en las hembras que en los machos, lo cual lleva a las hembras a elegir cuidadosamente cual será el padre de sus hijos ya que esta decisión condicionará la calidad genética de su descendencia. Por otro lado, los machos suelen dedicar mucho esfuerzo en la búsqueda de apareamientos a debido a que el costo de la inversión parental resulta menor que el potencial beneficio de dejar descendencia y, en términos generales, cuantos más apareamientos logren mayor será el número de descendientes que obtendrá. Este esquema es común en la mayoría de las especies de animales, sobre todo en aquellas cuyo sistema de apareamiento es de tipo poligínico, donde un macho puede potencialmente reproducirse con varias hembras (Harré 1991). Así, los machos suelen tener una tasa de apareamiento mayor que las hembras y por lo tanto compiten por el acceso a estas (Clutton-Brock y Vincent 1991, Clutton-Brock y Parker 1992), quienes los elegirán según determinados atributos de los machos conocidos como caracteres sexuales secundarios (Darwin 1871). Estos caracteres varían entre las especies y en el caso de los insectos suelen ser feromonas sexuales, rasgos morfológicos específicos, rituales de apareamiento durante el cortejo, regalos nupciales, entre otros. Cualquiera sea el caso, las hembras realizan una selección activa entre los machos obteniendo una recompensa al aparearse con los machos con mejores atributos. Estos beneficios pueden ser directos, por medio de un incremento de la supervivencia, fecundidad o algún otro rasgo (Gwynne 1984, Arnqvist y Nilsson 2000), o indirectos mediante un incremento del *fitness* de la descendencia (debido a la selección de un buen padre por parte de la madre) (Fedorka y Mousseau 2002). Sin embargo, aunque las hembras casi siempre muestran preferencia, los beneficios asociados a dicha preferencia no siempre resultan fáciles de evidenciar.

Moscas de la fruta de la familia Tephritidae

La familia Tephritidae (Diptera) cuenta con unas 4000 especies con hábitos muy variados. Esta familia se encuentra distribuida en las zonas templadas, tropicales y subtropicales de todo el mundo (Christenson y Foote 1960). Se trata de insectos con una gran capacidad para infestar diferentes especies vegetales, tanto nativas como exóticas. La mayoría de las moscas tefritidas ponen sus huevos en los tejidos de las plantas donde las larvas encuentran su alimento al eclosionar. Las estructuras vegetales que son utilizadas para el desarrollo larvario son variadas en esta familia, pero hay un importante número de especies que son capaces de atacar los frutos de una amplia gama de hospedadores, incluyendo numerosos frutos de importancia

económica (White y Elson-Harris 1992). Las especies de esta familia consideradas plaga se agrupan principalmente en cinco géneros: *Anastrepha* Schiner (1868), *Bactrocera* Macquart (1835), *Ceratitis* Macleay (1829), *Dacus* Collart (1935) y *Rhagoletis* Loew (1862), que se extienden globalmente, excepto en la Antártida (White y Elson-Harris 1992). Esto las hace objeto de muchos estudios, debido a que afectan la producción frutícola (Aluja y Liedo 1986). Estas moscas ocasionan daños físicos directos en la pulpa de las frutas por la perforación del fruto por parte de la hembra durante la oviposición, generando también, daños secundarios por permitir la entrada de microorganismos patógenos. Todo esto produce una maduración precoz y caída del fruto, y la consiguiente pérdida de la cosecha. Asimismo, ocasionan grandes pérdidas al restringir los mercados en los cuales se comercializará la fruta.

El ciclo biológico de la mosca consiste básicamente en cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (Aluja 1993) y comienza cuando la hembra deposita sus huevos dentro del fruto aún no maduro (Christenson y Foote 1960). Los huevos maduran y las larvas eclosionan y se alimentan del fruto atravesando tres estadios larvales. Luego, las larvas abandonan el fruto y buscan un lugar apropiado para empupar. Para este momento, el fruto se encuentra en estado de descomposición, y normalmente ya ha caído de la planta. La larva se entierra, tras lo cual su cutícula se endurece para formar un pupario dentro del cual muda al estado de pupa. Por último emerge el adulto que adquiere madurez sexual luego de algunos días, dependiendo de la especie y de su alimentación con fuentes proteicas.

Moscas de la familia Tephritidae como plagas en Argentina

La producción frutícola de regiones tropicales, subtropicales y templadas se ve afectada por moscas de la fruta pertenecientes a la familia Tephritidae. En Argentina se destacan por su importancia económica dos especies de moscas de la fruta: *Ceratitis capitata* Wiedemann y *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Figura 1.1). El perjuicio que estas moscas causan es doble: daño directo en la fruta por actividad de la larva y limitaciones para acceder a potenciales mercados por la imposición de restricciones cuarentenarias por parte de países libres de estas plagas (Malavasi *et al.* 1994).



Figura 1.1. Hembras de: *Ceratitidis capitata* (izquierda); *Anastrepha fraterculus* (derecha).

Ceratitidis capitata, conocida como mosca del Mediterráneo, es originaria de África y es una plaga cosmopolita muy importante debido a su gran capacidad invasora, destructiva y con un amplio rango de hospederos frutales (Christenson y Foote 1960). Fue introducida en el país a principios del siglo XX en cultivos cercanos a la ciudad de Buenos Aires (Vergani 1952). Más tarde fue reportada en las regiones del noreste y noroeste del país, extendiéndose hasta la Patagonia (Sánchez *et al.* 2001). Muestra una alta capacidad para adaptarse a diversos climas y a numerosas especies de hospederos frutales (más de 350, Liquido *et al.* 1991). Debido a su distribución e importancia, esta especie ha sido la más estudiada dentro de la familia Tephritidae.

Anastrepha fraterculus, conocida como mosca sudamericana de la fruta, es una especie nativa y se distribuye desde el sudeste de EE.UU. hasta el centro de Argentina (Salles 1995 Malavasi *et al.* 2000). Evidencia reciente muestra, no obstante, que *A. fraterculus* es en realidad un complejo de especies crípticas en el cual se han descrito al menos 7 morfotipos (Hernández-Ortiz *et al.* 2012). En Argentina se describió el morfotipo denominado “Brazilian 1”, debido a que este morfotipo se extiende hasta el sur de Brasil (Hernández-Ortiz *et al.* 2012), el cual se distribuye en regiones de clima tropical y subtropical (Ovruski *et al.* 2003) y coexiste con *C. capitata* en el noroeste y noreste del país (Ovruski *et al.* 2003, Segura *et al.* 2006). *Anastrepha fraterculus* es una especie generalista que ataca más de 100 especies de plantas hospederas (Norrbon 2004), muchas de las cuales tienen un alto valor comercial. Malavasi *et al.* (1983) encontraron una preferencia por sitios de oviposición en frutos inmaduros de la familia Myrtaceae nativas de Brasil y especialmente por frutos de *Psidium guajava* L., que es su principal hospedero.

Técnica del Insecto Estéril

En nuestro país, los programas de control se han focalizado principalmente en la mosca del Mediterráneo, siendo la aplicación de insecticidas el método más utilizado. Sin embargo, con el surgimiento de técnicas alternativas agrupadas en lo que se conoce como Manejo Integrado de Plagas comenzó a aplicarse la Técnica del Insecto Estéril (TIE) (Knipling 1955) en determinadas regiones contra *C. capitata*. La TIE se basa en la cría artificial, esterilización por irradiación y liberación de los insectos de la misma especie plaga, de manera tal que aquellas hembras que se apareen con un macho estéril (y no lo hagan con un macho silvestre) no producirán descendencia y así disminuirá el tamaño poblacional con sucesivas repeticiones del proceso (Metcalf y Luckman 1994). Si bien la TIE es actualmente implementada contra *C. capitata*, el control de *A. fraterculus* se basa únicamente en insecticidas, debido a que sólo existe información fragmentada sobre protocolos para el uso de la TIE en *A. fraterculus* (Cladera *et al.* 2014).

El desarrollo de la TIE en una nueva especie requiere de un buen conocimiento de la biología reproductiva de la plaga (Robinson y Hendrichs 2005), en especial de los factores que condicionan el éxito en el apareamiento de los machos (Hendrichs *et al.* 2002, Robinson *et al.* 2002). Determinar estos factores permitiría producir machos estériles con mayores probabilidades de ser aceptados por las hembras silvestres para el apareamiento (Hendrichs *et al.* 2002). Los principales avances en este sentido se relacionan con el uso de semioquímicos (Papadopoulos *et al.* 2008, Shelly 2008), el uso de proteína en la dieta de machos estériles (Yuval *et al.* 2007) y la reducción en el tiempo que requieren los machos para madurar sexualmente mediante el uso de metopreno, un análogo de la hormona juvenil (Teal *et al.* 2007).

Cortejo en *A. fraterculus*

El comportamiento sexual de *A. fraterculus* ha sido analizado en varios morfotipos de esta especie y existen estudios detallados para el morfotipo presente en nuestro país (Malavasi *et al.* 1983, Petit-Marty *et al.* 2004, Sciurano *et al.* 2007, Segura *et al.* 2007, Gómez Cendra *et al.* 2011). El apareamiento ocurre temprano durante la mañana, ocurriendo la mayoría de las cópulas durante las primeras 3 horas luego del amanecer, cuando los machos se agregan formando leks para atraer a las hembras (Malavasi *et al.* 1983). Los leks de *A. fraterculus* son similares a los descritos para otras especies del mismo género (Aluja *et al.* 1993) y puede ser

operacionalmente definido como la agregación de al menos 3 machos que simultáneamente realizan el comportamiento de llamado sexual en áreas claramente definidas, usualmente de hojas adyacentes de una misma rama (Segura *et al.* 2007). Una vez dentro del lek, los machos defienden pequeños territorios y exhiben un amplio repertorio de señales acústicas, visuales y químicas (feromonas sexuales) mediante las cuales atraen a las hembras hacia el lek. Como ocurre en otras especies de *Anastrepha*, la emisión de feromonas ocurre casi exclusivamente durante la expansión de protuberancias laterales ubicadas en la zona pleural abdominal, que se corresponden con las glándulas salivales que en los machos están más desarrolladas. Esta expansión suele estar asociada a la protrusión periódica del tejido anal que forma un saco (Nation 1989). Estos comportamientos de expansión y extrusión son normalmente acompañados por estallidos de rápidos movimientos de las alas (conocido como “fanning”) produciendo sonidos y dirigiendo el aire sobre la superficie del cuerpo. Esto ayuda a la difusión de las feromonas (Nation 1989) y otros compuestos volátiles por evaporación directamente desde la cutícula que provoca la atracción de las hembras. En *A. fraterculus* se desconoce el estímulo que provoca la formación de leks, pero se ha sugerido como responsables a los niveles de luminosidad y al propio comportamiento de señalización de los machos, principalmente a través de la liberación de feromonas (Malavasi *et al.* 1983).

Una vez dentro del lek, las hembras deciden con que macho aparearse, probablemente discriminándolos en función de señales químicas, visuales y acústicas. Dentro de las señales químicas, además de las feromonas sexuales, los compuestos cuticulares pueden ser fuente de semioquímicos y cumplir un rol importante en la atracción de hembras (Vaničková *et al.* 2012). Esto fue descrito por Nation (1989) para especies de *Anastrepha* muy emparentadas con *A. fraterculus*. Por ejemplo en *Anastrepha ludens* Loew, las hembras ya situadas en el lek se acercan y evalúan a un macho mediante lo que se presume que serían señales de muy corto alcance (2 o 3 cm). Una vez que la hembra se aproxima al macho a estas distancias, este deja de realizar el comportamiento de “fanning” y despliega sus alas formando un ángulo de 90° con el eje del cuerpo y ambos individuos se enfrentan. En este momento el macho se inclina ligeramente como si estuviese listo para saltar sobre la hembra, pero generalmente el salto no ocurre sino hasta que la hembra toca al macho con su proboscis, momento en el cual la hembra puede rechazarlo (Nation 1989). Sin embargo, en *A. fraterculus*, el mecanismo mediante el cual las hembras visitan los leks y eligen un macho para el apareamiento no está completamente comprendido (Burk 1981). Se ha demostrado que el éxito de apareamiento de los machos está relacionado con la actividad de llamado feromonal, la localización del macho dentro del lek (Segura *et al.* 2007) y rasgos morfológicos específicos tal como el tamaño de los

ojos (Sciurano *et al.* 2007, Segura *et al.* 2007). Estas evidencias sugieren que las decisiones que toman las hembras a la hora de elegir pareja pueden estar basadas en la integración de varios estímulos: químicos, visuales y probablemente vibratorios. Paralelamente, los volátiles de plantas hospederas podrían jugar un rol importante en esta decisión, sobre todo en relación con señales químicas de corto alcance mediante las cuales las hembras evalúan a los machos dentro de los leks (Landolt y Phillip 1997).

Anastrepha fraterculus es una especie poligínica, en donde unos pocos machos (los preferidos por las hembras) acaparan la mayoría de las cópulas. A su vez, puede presentarse la poliandria, ya que las hembras pueden volver a aparearse con otro macho, normalmente varios días después del primer apareamiento (Abraham *et al.* 2011). El único estudio en el que se ha focalizado el comportamiento de re-apareamiento en hembras de *A. fraterculus* registró un promedio de tres cópulas por hembra durante toda su vida (De Lima *et al.* 1994).

Semioquímicos para el mejoramiento del éxito de apareamiento de los machos

La producción y liberación de feromonas sexuales es una parte clave del comportamiento de apareamiento de muchos insectos. Muchas feromonas se producen intrínsecamente en el organismo (Tillman *et al.* 1999), pero en algunos insectos la producción de feromonas es impulsada o mejorada mediante el consumo de metabolitos secundarios de origen vegetal (Krasnoff y Dussourd 1989, Landolt y Phillips 1997, Reddy y Guerrero 2004, Beyaert y Hilker 2014). En muchos tefrítidos, los machos utilizan compuestos de plantas como precursores de feromonas sexuales (Landolt y Phillips 1997). Los machos de la mayoría de las especies de los géneros *Bactrocera* y *Ceratitis* son fuertemente atraídos a compuestos naturales que están involucrados en la comunicación mediada por sustancias químicas y son conocidos como semioquímicos (Cunningham 1989). Se sabe que algunas especies consumen estos compuestos y los utilizan en la síntesis de feromonas (Kumaran *et al.* 2013, 2014). Por ejemplo, la ingesta de metil eugenol de fuentes naturales de origen vegetal en el complejo de especies de *Bactrocera dorsalis* Hendel resulta en el almacenamiento de metabolitos en las glándulas rectales y su subsecuente liberación como parte de la feromona sexual durante el cortejo (Tan y Nishida 1996). Los machos que consumieron metil eugenol liberan una feromona sexual que atrae a más hembras que la feromona de machos que no consumieron este compuesto (Shelly y Dewire 1994). En el caso de *C. capitata*, por ejemplo, la exposición al aceite de la raíz de jengibre *Zingiber officinale* Rosc. (1807) o aceites de cítricos (mediante el contacto físico o solamente a través de sus volátiles) incrementa el éxito de apareamiento de los machos

(Katsoyannos *et al.* 1997, Papadopoulos *et al.* 2001, Shelly 2001), pero a diferencia de *Bactrocera*, se desconocen los mecanismos que subyacen a este fenómeno.

En el género *Anastrepha* es poco lo que se sabe acerca de los semioquímicos que incrementan el éxito de apareamiento en los machos. Se evaluó el efecto de la exposición al aceite de la raíz de jengibre sobre *A. ludens*, *Anastrepha obliqua* Macquart y *Anastrepha serpentina* Wiedemann, habiéndose registrado un mejoramiento del éxito de los machos expuestos solamente para esta última especie (Flores *et al.* 2011). En *A. ludens*, Morató *et al.* (2015) evaluaron el efecto de la exposición a aceites de cítricos pero solamente el aceite de pomelo mejoró el éxito de los machos. En el caso de *A. fraterculus*, se analizó el efecto de exponer a los machos a los volátiles emitidos por distintas frutas incluyendo guayaba, mango, naranja y limón (Vera *et al.* 2013). Se observó que la exposición a guayaba resultaba en machos más exitosos y que no era necesaria la ingesta para que se produzca dicha respuesta. Asimismo, la exposición a los aceites esenciales de limón también resultó en un efecto sobre el éxito en el apareamiento; sin embargo, en este caso se detectaron situaciones donde la exposición disminuyó el éxito de los machos y situaciones donde lo incrementó. El mejoramiento del éxito de apareamiento logrado en machos de *Bactrocera* y *Ceratitis* sugiere que para *Anastrepha* pueden existir compuestos similares que esperan ser descubiertos (Pereira *et al.* 2011a), así como los mecanismos subyacentes al efecto potenciador del éxito de apareamiento de los machos.

El metopreno como mejorador del éxito de apareamiento de los machos

En los insectos, la hormona juvenil (HJ) regula el comportamiento reproductivo de los adultos (Happ 1992, Wyatt y Davey 1996, Gilbert *et al.* 2000, Wilson *et al.* 2003) y en muchos casos puede reducir los tiempos de maduración sexual. Un análogo de la HJ, el metopreno, ha sido muy estudiado en moscas de la fruta por su capacidad de reducir los tiempos de maduración de los machos (Teal *et al.* 2011, Segura *et al.* 2013), algo que tiene importantes implicancias en el manejo de estas plagas por medio de la TIE. En machos de *A. fraterculus* y de otras especies del mismo género, la aceleración de la maduración sexual atribuida al metopreno induce una competitividad sexual en machos de 6 días post-emergencia comparable a la de machos maduros sexualmente (10 días post-emergencia) (Pereira *et al.* 2009, 2011b, Segura *et al.* 2009, Gómez-Simuta y Teal 2010, Gómez-Simuta y Teal 2010, Liendo *et al.* 2013). De esta forma, se ha demostrado que el tratamiento con este análogo de la HJ no provoca un efecto detrimental en la calidad del macho que se libera al campo durante la TIE.

Recientemente se ha propuesto que el metopreno, además de acelerar la maduración sexual, puede producir un efecto potenciador del éxito de apareamiento de los machos incluso a edades superiores a los 10 días de edad; un efecto potencialmente similar al que provoca la exposición a fuentes naturales de compuestos en estas moscas tefrítidas. Sin embargo, la potenciación del éxito en machos tratados con metopreno fue muy poco estudiada y no se conocen los mecanismos asociados a tal efecto. Se sabe que en muchos insectos la hormona juvenil (HJ) puede ser transferida del macho a la hembra durante la cópula, lo que en la hembra desencadena una respuesta fisiológica que le ayuda al desarrollo de oocitos, aumentando la fecundidad (Park *et al.* 1998, Shu *et al.* 1998, Gillott 2003, Gruntenko *et al.* 2005, Pszczolkowski *et al.* 2006, Clifton *et al.* 2014). En base a este conocimiento, podría postularse que los machos tratados con metopreno ven aumentado su éxito de apareamiento debido a que las hembras los prefieren por ser estos mejores dadores de HJ durante la cópula. A su vez, las hembras más jóvenes resultarían más beneficiadas por aparearse con machos tratados con metopreno debido a que estas se encontrarían en una fase inicial de maduración de oocitos.

1.2. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de compuestos naturales sobre el éxito en el apareamiento de machos de *A. fraterculus* y dilucidar los mecanismos causantes de dicho efecto contribuyendo a la búsqueda de semioquímicos que permitan un manejo más eficiente de esta plaga de los frutales.

Objetivos particulares

- 1- Evaluar el efecto de los volátiles del fruto de la guayaba sobre el éxito de apareamiento de los machos y dilucidar los mecanismos subyacentes de este fenómeno. (Capítulo 2).
- 2- Determinar si el incremento del éxito de apareamiento de los machos expuestos a volátiles del fruto de la guayaba se debe a un cambio cualitativo de las señales químicas emitidas por el macho durante el cortejo sexual. (Capítulo 3).
- 3- Evaluar el efecto del tratamiento de topicado con metopreno sobre el éxito de apareamiento de los machos y dilucidar los mecanismos subyacentes de este fenómeno. (Capítulo 4).

4- Determinar si la preferencia de las hembras por machos expuestos a guayaba o tratados con metopreno se debe a un beneficio directo relacionado con la fecundidad o fertilidad. (Capítulo 5).

1.3. Hipótesis

Las hipótesis propuestas en el marco de esta tesis doctoral se enuncian a continuación:

En referencia al efecto de compuestos producidos por las plantas sobre el comportamiento sexual de *A. fraterculus* (Capítulos 2 y 3):

- 1- Existen compuestos específicos liberados por el fruto de la guayaba que desencadenan un incremento en el éxito de apareamiento en machos.
- 2- Los machos expuestos a guayaba realizan despliegues sexuales más frecuentes y liberan mayor cantidad de feromona que machos no expuestos durante el período de actividad sexual.
- 3- Tras la exposición a volátiles de guayaba, los machos de *A. fraterculus* adquieren un aroma particular que las hembras son capaces de detectar mediante quimiorreceptores ubicados en sus antenas.

En referencia al efecto del metopreno sobre el comportamiento sexual de *A. fraterculus* (Capítulo 4):

- 4- El tratamiento tópico con metopreno aumenta el éxito de apareamiento de los machos de *A. fraterculus*.
- 5- Los machos tratados con metopreno realizan despliegues sexuales más frecuentes y liberan mayor cantidad de feromona que machos no tratados durante el período de actividad sexual.
- 6- La preferencia de las hembras por machos tratados con metopreno es dependiente de la edad de las mismas.

Sobre los mecanismos evolutivos que explican la preferencia sexual de las hembras de *A. fraterculus* (Capítulo 5):

7- Las hembras que eligen aparearse con machos tratados con metopreno o expuestos a volátiles de guayaba obtienen un beneficio directo relacionado con una mayor fecundidad, fertilidad y/o reducción del periodo pre-oviposicional.

1.4. Referencias

- Abraham S, Goane L, Rull J, Cladera J, Willink E y Vera MT.** 2011. Multiple mating in *Anastrepha fraterculus* females and its relationship with fecundity and fertility. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 141(1): 15-24.
- Aluja M y Liedo P.** 1986. Future perspectives on integrated management of fruit flies in Mexico. *Pest Control: Operations and Systems Analysis in Fruit Fly Management*. Springer, Berlin. 12-48.
- Aluja M.** 1993. Manejo integrado de la mosca de la fruta. Editorial Trillas SA de CV, Ciudad de Mexico.
- Aluja M y Birke A.** 1993. Habitat use by adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a mixed mango and tropical plum orchard. *Annals of the Entomological Society of America*. 86(6): 799-812.
- Arnqvist G y Nilsson T.** 2000. The evolution of polyandry: Multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*. 60: 145-164.
- Beyaert I y Hilker M.** 2014. Plant odour plumes as mediators of plant-insect interactions. *Biological Reviews*. 89(1): 68-81.
- Burk T.** 1981. Signalling and sex in acalypterate flies. *Florida Entomologist*. 66: 30-43.
- Christenson LD y Foote RH.** 1960. Biology of fruit flies. *Annual Review of Entomology*. 5(1): 171-192.
- Cladera JL, Vilardi JC, Juri M, Paulin LE, Giardini MC, Gómez-Cendra PV, et al.** 2014. Genetics and biology of *Anastrepha fraterculus*: research supporting the use of the sterile insect technique (SIT) to control this pest in Argentina. *BMC genetics*. 15(2).
- Clifton, ME, Correa S, Rivera-Perez C, Nouzova M y Noriega FG.** 2014. Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 64: 40-47.
- Clutton-Brock TH y Vincent AC.** 1991. Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature*. 351(6321): 58-60.
- Clutton-Brock TH y Parker GA.** 1992. Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *Quarterly Review of Biology*. 67: 437-456.
- Cunningham RT.** 1989. Parapheromones. En: *fruit flies, their biology, natural enemies and control*. Ed. Robinson AS, Hooper G. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 3A: 221-230.
- Darwin C.** 1871. La descendencia del hombre y la selección en relación al sexo.
- De Lima IS, Howse PE y Salles LAB.** 1994. Reproductive behavior of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field studies. *Physiological Entomology*. 19: 271-277.
- Fedorka KM y Mousseau TA.** 2002. Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry. *Animal Behaviour*. 64: 361-367.
- Flores S, Rivera JP, Hernandez E y Montoya P.** 2011. The Effect of Ginger Oil on the Sexual Performance of *Anastrepha* Males (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 94(4): 916-922.
- Gilbert LI, Granger NA y Roe RM.** 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30(8): 617-644.
- Gillott C.** 2003. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*. 48(1): 163-184.

- Gómez-Cendra P, Calcagno G, Belluscio L y Vilardi JC.** 2011. Male courtship behavior of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, from an Argentinean laboratory strain. *Journal of Insect Science*. 11(1): 175.
- Gomez-Simuta Y y Teal PEA.** 2010. Hormonas juveniles y su aplicación en la Técnica del Insecto Estéril. *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*. Ed. Montoya P, Toledo J, Hernandez ES. Mexico. Pp. 357-368.
- Gruntenko NE, Karpova EK, Adonyeva NV, Chentsova NA, Faddeeva NV, Alekseev AA, et al.** 2005. Juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and dopamine interaction in *Drosophila virilis* reproduction under normal and nutritional stress conditions. *Journal of Insect Physiology*. 51(4): 417-425.
- Gwynne DT.** 1984. Courtship feeding increases female reproductive success in bushcrickets. *Nature*. 307: 361-63.
- Happ GM.** 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology*. 37(1): 303-320.
- Harré R.** 1991. Diccionario de etología y aprendizaje animal. *Paidós*. ISBN 84-7509-714-6.
- Hendrichs J, Robinson AS, Cayol JP y Enkerlin W.** 2002. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. *Florida Entomologist*. 85(1): 1-13.
- Hernández-Ortiz V, Bartolucci AF, Morales-Valles P, Frías D y Selivon D.** 2012. Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America*. 105(2): 305-318.
- Karlson P y Lüscher M.** 1959. "Pheromones": A New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature*. 183: 55-56.
- Katsoyannos BI, Kouloussis NA y Papadopoulos NT.** 1997. Response of *Ceratitis capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 82(2): 181-188.
- Knipling EF.** 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*. 48(4): 459-462.
- Krasnoff SB y Dussourd DE.** 1989. Dihydropyrrrolizine attractants for arctiid moths that visit plants containing pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chemical Ecology*. 15(1): 47-60.
- Kumaran N, Balagawi S, Schutze MK y Clarke AR.** 2013. Evolution of lure response in tephritid fruit flies: phytochemicals as drivers of sexual selection. *Animal Behaviour*. 85(4): 781-789.
- Kumaran N y Clarke AR.** 2014. Indirect effects of phytochemicals on offspring performance of Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 138(5): 361-367.
- Landolt PJ y Phillip TW.** 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*. 42: 371-91. PMID: 15012318
- Liendo MC, Devescovi F, Bachmann GE, Utgés ME, Abraham S, Vera MT, et al.** 2013. Precocious sexual signalling and mating in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males achieved through juvenile hormone treatment and protein supplements. *Bulletin of Entomological Research*. 103(1): 1-13.
- Liquido NJ, Shinoda L y Cunningham RT.** 1991. Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*. 77: 1-52.
- Malavasi A, Morgante JS y Prokopy RJ.** 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and nonhost trees. *Annals of the Entomological Society of America*. 76(2): 286-292.
- Malavasi A, Rohwer GG y Campbell DS.** 1994. Fruit Fly Free Areas: Strategies to develop them. En: *Fruit flies and the sterile insect technique*. Eds. Calkins CO, Klassen W y Liedo P. CRC Press, Boca Raton, Fla. 165-180.
- Malavasi A, Zucchi RA y Sugayama R.** 2000. Biogeografía. In: *Moscas-das-frutas de importancia económica no Brasil. Conhecimento básico e aplicado*. Ed. Malavasi A, Zucchi RA. Holos Editora, Riberão Preto, Brasil, 93-98.
- Metcalfe RL y Luckmann WH.** 1994. Introduction to Insect Pest Management. 3rd edn. New York: Wiley. 672 pp.

- Morató S, Shelly T, Rull J y Aluja M.** 2015. Sexual competitiveness of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) males exposed to Citrus aurantium and Citrus paradisi essential oils. *Journal of Economic Entomology*. tou054.
- Nation JL.** 1989. The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies. En: *World crop pests: fruit flies, their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam. pp. 189–205.
- Norrbom AL.** 2004. Fruit fly (Tephritidae) host plant database. Version Nov. 2004 (<http://www.sel.barc.usda.gov:591/diptera/Tephritidae/TephHosts/search.html>).
- Ortiz G.** 1999. Potential use of the sterile insect technique against the South American fruit fly. En: *The South American Fruit Fly, Anastrepha fraterculus (Wied.): advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies*. IAEA TEC-DOC 1064. Ed. International Atomic Energy Agency, The International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 121–130.
- Ovruski S, Schliserman P y Aluja M.** 2003. Native and Introduced Host Plants of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Northwestern Argentina. *Journal of Economic Entomology*. 96(4): 1108-1118.
- Papadopoulos NT, Katsoyannos BL, Kouloussis NA y Hendrichs J.** 2001. Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 99: 253–261.
- Papadopoulos NT, Kouloussis NA y Katsoyanos BI.** 2008. En: *Proceedings of the 7th International Symposium on fruit Flies of Economic Importance*. Ed. Sugayama RL, Zucchi RA, Ovruski SM y Sivinski J. Press Color Graficos Especializados, Brotas, Bahia, Brazil.
- Park YI, Shu S, Ramaswamy SB y Srinivasan A.** 1998. Mating in *Heliothis virescens*: transfer of juvenile hormone during copulation by male to female and stimulation of biosynthesis of endogenous juvenile hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 38(2): 100-107.
- Pereira R, Sivinski J y Teal PE.** 2009. Influence of methoprene and dietary protein on male *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) mating aggregations. *Journal of Insect Physiology*. 55(4): 328-335.
- Pereira R, Teal, PEA, Conway H, Worley J y Sivinski J.** 2011a. Influence of methoprene and protein on maturation and sexual performance of sterile *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) males. *Journal of Applied Entomology*. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01668.x.
- Pereira R, Yuval B, Liedo P, Teal PEA, Shelly TE, McInnis DO y Hendrichs J.** 2011b. Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *Journal of Applied Entomology*. doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01664.x.
- Petit-Marty N, Vera MT, Calcagno G, Cladera JL, Segura DF, Allinghi A, et al.** 2004. Sexual behavior and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*. 97: 1320–1327.
- Pszczolkowski MA, Tucker A, Srinivasan A y Ramaswamy SB.** 2006. On the functional significance of juvenile hormone in the accessory sex glands of male *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology*. 52(8): 786-794.
- Reddy GVP y Guerrero A.** 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Science*. 9: 253–261. PMID: 15130551
- Robinson AS, Cayol JP y Hendrichs J.** 2002. Recent findings on medfly sexual behavior: implications for SIT. *Florida Entomologist*. 85(1): 171-181.
- Robinson AS y Hendrichs J.** 2005. Prospects for the future development and application of the sterile insect technique. En: *Sterile Insect Technique*. Springer Netherlands. pp. 727-760.
- Salles LAB.** 1995. Bioecologia e Control das Moscas das Frutas Sul-Americanas. EMBRAPA-CPACT, Pelotas, Brazil.
- Sanchez RA, Rial EJ y Mongabure AP.** 2001. Advances in the programme for the eradication of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* Wied.) in the Patagonia region, Argentina. En: *Proc. 4th Meeting of the WGFFWH*. pp. 206-207.
- Sciurano RB, Segura DF, Rodriguero M, Gómez Cendra P, Allinghi A, Cladera JL, et al.** 2007. Sexual selection on multivariate phenotype in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Florida Entomologist*. 90: 163–170.
- Segura DF, Vera MT, Cagnotti CL, Vaccaro N, De Coll O, Ovruski SM y Cladera JL.** 2006. Relative abundance of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in diverse host species and localities of Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*. 99(1): 70-83
- Segura DF, Vera MT, Rodríguez MF, Utges ME, Vilardi JC, et al.** 2006. Juvenile hormone treatment accelerates male sexual maturation in *Anastrepha fraterculus*. *Proceedings, 7th International*

- Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*. 10–15 September 2006. Salvador de Bahia, Brazil.
- Segura DF, Petit-Marty N, Sciarano RB, Vera MT, Calcagno G, Allinghi A, et al.** 2007. Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 90: 154–162.
- Segura DF, Cáceres C, Vera MT, Wornoayporn V, Islam A, Teal PEA, et al.** 2009. Enhancing mating performance after juvenile hormone treatment in *Anastrepha fraterculus*: a differential response in males and females acts as a physiological sexing system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 131(1): 75–84.
- Segura DF, Utgés ME, Liendo MC, Rodríguez MC, Devescovi F, Vera M, et al.** 2013. Methoprene treatment reduces the pre-copulatory period in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 19–29.
- Shelly TE y Dewire AM.** 1994. Chemically mediated success in male Oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 375–382.
- Shelly TE.** 2001. Exposure to alpha-copaene and alpha-copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 94: 497–502.
- Shelly TE.** 2008. Aromatherapy and Medfly SIT. En: *Proceedings of the 7th International Symposium on fruit Flies of Economic Importance*. Eds. Sugayama RL, Zucchi RA, Ovruski SM y Sivinski J. Press Color Graficos Especializados, Brotas, Bahia, Brazil.
- Shu S, Park YI, Ramaswamy SB y Srinivasan A.** 1998. Temporal profiles of juvenile hormone titers and egg production in virgin and mated females of *Heliothis virescens* (Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*. 44: 1111–1117.
- Tan KH y Nishida R.** 1996. Sex pheromone and mating competition after methyl eugenol consumption in the *Bactrocera dorsalis* complex. En: *Fruit fly pests—a world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray, FL USA. 147–153.
- Teal PEA, Gómez-Simuta Y, Dueben BD, Holler TC y Olson SR.** 2007. Improving the efficacy of the sterile insect technique for fruit flies by incorporation of hormone and dietary supplements into adult holding protocols. *Area-Wide Control of Insect Pests*. pp. 163-173.
- Teal PEA, Pereira R, Segura DF, Haqi, Gómez-Simuta Y, Robinson AS y Hendrichs J.** 2011. Methoprene and protein supplements accelerate reproductive development and improve mating success of male tephritid flies. *Journal of Applied Entomology*. 1439-0418.
- Tillman JA, Seybold SJ, Jurenka RA y Blomquist GJ.** 1999. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29(6): 481-514.
- Trivers R.** 1972. Parental investment and sexual selection. En: *Sexual selection and the descent of man*. Ed. Campbell B. Biological Laboratories, Harvard University. 136: 179.
- Tumlinson S y Teal PEA.** 1987. Relationship of structure and function to biochemistry in insect pheromone systems. *Pheromone biochemistry*, Academic Press, London. 1: 3-26.
- Vaničková L.** 2012. Chemical ecology of fruit flies genera *Ceratitidis* and *Anastrepha*. Tesis Doctoral. Instituto de Tecnología Química, Praga, República Checa.
- Vera MT, Ruiz MJ, Oviedo A, Abraham S, Mendoza M, Segura DF, et al.** 2012. Are the wild and laboratory insect populations different in semiochemical emission? The case of the medfly sex pheromone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(29): 7168-7176.
- Vera MT, Ruiz MJ, Oviedo A, Abraham S, Mendoza M, Segura DF, et al.** 2013. Fruit compounds affect male sexual competitiveness in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 2–10.
- Vergani AR.** 1952. La mosca del Mediterráneo *Ceratitidis capitata*. *Boletín de Sanidad Vegetal* 8(22).
- White IM y Elson-Harris MM.** 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. CAB International.
- Wilson TG, DeMoor S y Lei J.** 2003. Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the Methoprene-tolerant 27 mutant phenotype. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33(12): 1167-1175.
- Wyatt GR y Davey KG.** 1996. Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone. II. Roles of Juvenile Hormone in Adult Insects. *Advances in insect physiology*. 26(1).

Yuval B, Maor M, Levy K, Kaspi R, Taylor P y Shelly T. 2007. Breakfast of champions or kiss of death? Survival and sexual performance of protein-fed, sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 90(1): 115-122.

Capítulo 2

Efecto de la exposición a volátiles de frutos de guayaba sobre el comportamiento de llamado sexual y la emisión de feromona en machos de *Anastrepha fraterculus*

Este capítulo fue publicado como:

Bachmann GE, Segura DF, Devescovi F, Juárez ML, Ruiz MJ, Vera MT, Cladera JL, Teal PEA y Fernández PC. 2015. Male sexual behavior and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. *PLoS one*. 10(4): e0124250. doi: 10.1371/journal.pone.0124250

2.1. Introducción

Los fitoquímicos (compuestos de origen vegetal biológicamente activos) son conocidos por afectar el comportamiento y la fisiología de muchos insectos (Schoonhoven et al. 2005), hecho que se extiende al comportamiento reproductivo de los machos. En varias especies de insectos fitófagos, los machos son atraídos por compuestos volátiles liberados por sus plantas hospederas, incrementando la probabilidad del encuentro con las hembras (Thornhill y Alcock 1983, Bernays y Chapman 1994). Asimismo, las plantas hospederas pueden ofrecerle a los machos otros beneficios no relacionados al encuentro de la pareja. Es así como en algunas especies, los machos aumentan sus probabilidades de ser elegidos por las hembras para aparearse haciendo uso de compuestos químicos de las plantas (Landolt y Phillips 1997). En este escenario, se han reportado ejemplos de machos que utilizan fitoquímicos como feromonas o precursores de estas. En otros casos, estos compuestos químicos sinergizan, inducen o mejoran la emisión de feromonas sexuales o la respuesta del receptor (revisado en Landolt y Phillips 1997 y en Reddy y Guerrero 2004).

Las moscas de la fruta de la familia Tephritidae muestran una gran variedad de estrategias de apareamiento, donde las plantas cumplen un rol importante en el comportamiento sexual y el éxito de apareamiento de los machos (Díaz-Fleischer y Aluja 2000). En algunas especies monófagas u oligófagas, las plantas hospederas sirven como sitio de encuentro de ambos sexos. Como ejemplo, se puede citar a la mosca de la manzana, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) donde los machos se posan sobre el hospedero y esperan la llegada de hembras con las que se aparean (Prokopy et al. 1971). En otras especies, los machos forman grupos (denominados “leks”) y liberan feromonas sexuales que atraen a las hembras (Prokopy 1980, Burk 1981, Shelly y Kaneshiro 1991). Este comportamiento de apareamiento es típico de especies polífagas, en las cuales la localización de las hembras es menos predecible.

Dentro de las especies que forman leks se han reportado casos donde ciertos compuestos de las plantas afectan la comunicación entre sexos y el éxito en el apareamiento de los machos. Por ejemplo, los machos de *Bactrocera dorsalis* Hendel ingieren metil eugenol, un compuesto natural encontrado en varias especies de plantas, el cual utilizan como precursor para la síntesis de feromonas sexuales que incrementa la atracción de hembras (Shelly y Dewire 1994, Tan y Nishida 1996, Nishida et al. 1997). Del mismo modo, cuando los machos de *Bactrocera tryoni* Froggatt se alimentan con cuelure y zingerone [compuestos químicos derivados de las cetonas que atraen fuertemente a muchas especies del género *Bactrocera* (Kumaran et al. 2013)] estos compuestos aumentan el éxito de apareamiento de

los machos, lo cual está relacionado a cambios en la composición de las feromonas (Kumaran *et al.* 2013, 2014a). En *Ceratitis capitata* Wiedemann, la exposición a volátiles de frutas que presentan el sesquiterpeno α -copeno también incrementa el éxito de apareamiento en machos (Papadopoulos *et al.* 2001, Shelly *et al.* 2008). Los mecanismos que subyacen a este fenómeno son menos comprendidos que para *B. dorsalis*. Shelly (2001) y Papadopoulos *et al.* (2006) hipotetizaron que el aumento del éxito de apareamiento de los machos estaría relacionado a un incremento de liberación de feromonas sexuales durante el comportamiento de llamado. A su vez, Shelly *et al.* (2007) proponen que, además, podría darse una alteración de las señales olfativas derivada de los machos expuestos a estos compuestos volátiles. Este fenómeno se ha explorado recientemente en la mosca del olivo, *Bactrocera oleae* Gmelin, una especie monófaga donde los machos atraen a las hembras mediante la liberación de feromonas. En esta especie, la exposición de α -pineno incrementa la performance de apareamiento de los machos y hembras (Gerofotis *et al.* 2013).

En la mosca sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), se encontró que los machos expuestos a frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.), uno de los hospederos primarios de esta especie, eran preferidos por las hembras frente a machos de igual edad y origen que no habían sido expuestos a este fruto (Vera *et al.* 2013). Adicionalmente, los machos silvestres que habían sido expuestos a la guayaba lograban aparearse más rápidamente que los machos no expuestos. Esto se verificó, incluso, cuando los machos fueron sólo expuestos a los volátiles de la fruta, no permitiéndoles el contacto físico con la misma. La exposición a otras frutas hospederas de *A. fraterculus*, como el mango, no mejoró el desempeño sexual de los machos. Nuevamente, se desconocen los mecanismos mediante los cuales los machos de *A. fraterculus* expuestos a guayaba son capaces de obtener una ventaja.

El descubrimiento de compuestos naturales que mejoran el éxito de apareamiento de machos en insectos fitófagos puede tener una importante relevancia económica, especialmente cuando se trata de una especie plaga. Varias especies de moscas de los frutos de la familia Tephritidae se controlan mediante la Técnica del Insecto Estéril (TIE) (Enkerlin 2005), en la cual la competitividad por el apareamiento (o el éxito de apareamiento) de los machos que se liberan es crítica (Prokopy 1979). Consecuentemente, el desarrollo de métodos para aumentar el desempeño sexual de los machos ha sido el foco de intensa investigación. En este contexto, la exposición de los machos estériles a volátiles de guayaba previamente a su liberación podría incrementar su competitividad por el acceso a hembras silvestres. Sin

embargo, para *A. fraterculus*, este fenómeno fue solamente descrito para hembras de laboratorio y aún queda por comprender los mecanismos asociados al mismo.

2.1.1. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de los volátiles del fruto de la guayaba sobre el éxito de apareamiento de los machos y dilucidar los mecanismos subyacentes de este fenómeno.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar si la exposición a volátiles de guayaba incrementa el éxito de apareamiento de los machos de laboratorio compitiendo por hembras silvestres.
- 2- Evaluar el efecto de la exposición a los volátiles de guayaba sobre la cantidad de feromona liberada y el comportamiento de llamado sexual de los machos.
- 3- Determinar si el incremento del éxito copulatorio de los machos provocado por la exposición a guayaba puede replicarse/repetirse exponiendo a los machos a una mezcla artificial de compuestos presentes en los volátiles de guayaba.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material biológico

Las moscas adultas de *A. fraterculus* utilizadas para todos los experimentos de este capítulo fueron obtenidas de dos fuentes distintas: de una colonia de laboratorio y de la naturaleza (silvestres). Las moscas de laboratorio fueron criadas en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF), INTA Castelar, a partir de una colonia inicialmente establecida en los laboratorios de Zoología Agrícola (Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, Tucumán). Esta colonia fue iniciada en 1997 con pupas obtenidas de frutos de guayaba colectados en los alrededores de la localidad de Tafí Viejo, Tucumán (Jaldo 2001). La cría y mantenimiento de larvas y adultos siguió el procedimiento estándar. Para las larvas se utilizó una dieta artificial basada en levadura de cerveza (CALSA, Tucumán), germen de trigo, azúcar y agar (proporciones en peso 15:15:15:1, respectivamente). Las moscas silvestres fueron

obtenidas a partir de frutos de guayaba en la localidad de Horco Molle, Tucumán. Los frutos fueron colocados sobre bandejas de plástico perforadas y a su vez éstas sobre otras bandejas con una base de arena como sustrato de pupación. En estas condiciones, la arena fue tamizada dos veces por semana para recuperar las pupas. Las hembras adultas (laboratorio y silvestres) fueron alimentadas con una mezcla de azúcar, hidrolizado de levadura (MP Biomedicals, San Francisco, California, EE.UU.) e hidrolizado de maíz (ARCOR, Tucumán) (proporciones en peso 4:1:1, respectivamente) (Jaldo *et al.* 2001, Vera *et al.* 2007). Los machos adultos (laboratorio y silvestre) fueron alimentados con azúcar y levadura de cerveza (CALSA) (proporciones en peso 3:1, respectivamente). Todos los individuos fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas (T: 24 ± 2 °C, RH: $70 \pm 10\%$ y un fotoperíodo de luz/oscuridad de 12hs). Estas dietas permiten que los adultos alcancen su madurez en un tiempo máximo post-emergencia de: 14 días para hembras de laboratorio; 18 días para hembras silvestres; 10 días para machos de laboratorio; y 14 días para machos silvestres (Jaldo 2001, Petit-Marty *et al.* 2004, Vera *et al.* 2006, Jaldo *et al.* 2007). Una vez emergidos como adultos y con la ayuda de un aspirador, las moscas fueron separadas según el sexo. Las hembras fueron situadas en contenedores plásticos cilíndricos de 1 L (11 cm de altura y 10,8 cm de diámetro) en grupos de 25 individuos. Los machos se ubicaron en jaulas plásticas de 22 L (37 x 28 x 21 cm) en grupos de 100 individuos. Todas las moscas utilizadas en los ensayos de apareamiento (ver más adelante) se encontraban sexualmente maduras: >10 días post-emergencia para machos de laboratorio; >14 días post-emergencia para machos silvestres; >14 días post-emergencia para hembras de laboratorio y >18 días post-emergencia para hembras silvestres (Jaldo 2001, Petit-Marty *et al.* 2004, Jaldo *et al.* 2007, Segura *et al.* 2013).

2.2.2. Efecto de la exposición a volátiles de frutos de guayaba sobre el éxito de apareamiento, el comportamiento de llamado sexual y la liberación de feromonas de los machos

La exposición de los machos a los volátiles de guayaba se realizó siguiendo el procedimiento general de Vera *et al.* (2013). Los frutos de guayaba que se utilizaron para la exposición a los machos se colectaron en la localidad de Horco Molle, Tucumán y se extrajeron directamente desde el árbol cuando el fruto muestra un color verde claro – amarillo. Los frutos se lavaron con agua, se cortaron en mitades y se colocaron en contenedores cilíndricos de plástico de 250 ml (aproximadamente 16 cm de altura y 8 cm de diámetro) los cuales se cubrieron con tela tul. La cantidad de fruta en cada contenedor fue de aproximadamente 200 g (correspondiente a aproximadamente 3 guayabas de tamaño mediano). La tela tul impidió que los machos tengan

acceso a la frutas, pero permitió su exposición a los volátiles que emanan de las mismas. Este contenedor con guayaba (llamado “unidad de exposición”) (Figura 2.1) se colocó dentro de una jaula de 40 x 20 x 20 cm que contenía aproximadamente 100 machos de *A. fraterculus*, cuando estos se encontraban sexualmente inmaduros (< 10 días post-emergencia). Los machos control no fueron expuestos a los volátiles de guayaba y se mantuvieron en salas separadas y alejadas con el fin de prevenir cualquier exposición a volátiles de guayaba. Dentro de de cada jaula que alojaba a los machos se colocaron tres unidades de exposición. Los frutos fueron reemplazados cada dos días hasta el final del período de exposición, el cual dependió de la disponibilidad de fruta y duró de dos a once días. La exposición finalizó al menos 24 horas antes de los ensayos de apareamiento. Luego del período de exposición, las jaulas con machos fueron transferidas a una habitación libre de volátiles de guayaba, en la cual los machos fueron mantenidos en las mismas jaulas hasta ser utilizados en los experimentos. Los machos control (no expuestos) fueron mantenidos en diferentes salas con las mismas condiciones ambientales pero sin exposición a guayabas. La edad de los machos al momento de las pruebas de apareamiento (ver sección 2.2.1.1) fueron 10-14 días para machos de laboratorio y 17-20 días para machos silvestres.



Figura 2.1. Unidad de exposición. Lista para ser introducida en las jaulas con los machos.

2.2.2.1. Experimento 1. Éxito de apareamiento

Para evaluar si los machos expuestos a guayaba poseen mayor éxito de apareamiento que los machos no expuestos se realizaron pruebas de preferencia para el apareamiento (de ahora en

más “pruebas de apareamiento”). En ellas se registra el tipo de macho que es preferido por las hembras para el apareamiento. Estas pruebas se realizaron en arenas experimentales para las cuales se utilizaron recipientes plásticos cilíndricos de 1 L de capacidad (aproximadamente 11 cm de altura y 11 cm de diámetro) que fueron cubiertos con una tela tul (Figura 2.2). En cada una de estas arenas experimentales (réplicas) se colocó un macho tratado, un macho no tratado (control) y una hembra, todos sexualmente maduros y vírgenes. Para poder distinguir entre machos tratados y machos control se agregó colorante alimentario (Fleibor, Tablada, Buenos Aires) al alimento de los machos. De esta forma, el abdomen toma el color del colorante. Se utilizaron los colores rojo y azul, los cuales se alternaron entre tratamientos para los sucesivos ensayos. Los machos competidores difirieron entre sí solamente en el tratamiento (expuesto o no expuestos) y en la coloración adquirida. El día de la prueba de apareamiento, aproximadamente a las 9:00 a.m. y bajo condiciones de semi oscuridad se liberaron los machos dentro de las arenas experimentales y 15 minutos después se liberaron las hembras. Una vez ubicados todos los individuos se encendieron las luces. A partir de ese momento se comenzó a registrar el tiempo y a monitorear continuamente la ocurrencia de apareamientos. Al detectar una cópula, se registró el tipo de macho y el tiempo al cual la cópula comenzó y finalizó, pudiendo así calcular la latencia de la cópula (definida como el tiempo que transcurre desde la liberación de las hembras hasta el inicio de la cópula) y la duración de la misma. Estas pruebas de apareamiento se realizaron bajo condiciones de laboratorio controladas ($T^{\circ}: 24 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{RH}: 60 \pm 10\%$). La iluminación se proporcionó con tubos fluorescentes y luz natural ingresando desde ventanas. Dado que las poblaciones de *A. fraterculus* de Argentina presentan un corto período de apareamiento diario que ocurre temprano en la mañana (Petit-Marty *et al.* 2004, Vera *et al.* 2006, 2013), cada prueba de apareamiento duró dos horas. Todas las hembras utilizadas en este experimento fueron silvestres, debido a que en otras especies de tefrítidos se evidenció que estas poseen mayor capacidad de discriminación entre distintas calidades de machos que las hembras de laboratorio (Briceño *et al.* 2007). Se evaluaron un total de 130 arenas experimentales para machos de laboratorio y 329 para machos silvestres.



Figura 2.2. Arenas experimentales utilizadas en las pruebas de preferencia para el apareamiento. Cada una contiene un macho expuesto, un macho no expuesto y una hembra.

2.2.2.2. Experimento 2: Comportamiento de llamado y liberación de feromona

En este experimento se comparó el comportamiento de llamado y la liberación de feromona entre machos expuestos y no expuestos a frutos de guayaba. El comportamiento de llamado se registró con el fin de estimar la actividad de llamado sexual de los machos. Cada réplica consistió en 10 machos (expuestos a guayaba o no expuestos) ubicados en cámaras de colecta de volátiles. Estas cámaras de forma cilíndrica (20 cm de largo y 4 cm de diámetro) y 250 ml de capacidad (Figura 2.3) son de vidrio translúcido e incoloro lo que permitió la observación. El registro del comportamiento se realizó a intervalos de 30 minutos durante las primeras 3 horas de la mañana (período en el cual los machos realizan los despliegues sexuales), alcanzando un total de 7 observaciones para cada réplica (Teal *et al.* 2000). En cada intervalo se observó el comportamiento de los machos, particularmente registrando el número de machos que se encontraban realizando: 1) “fanning” un comportamiento que consiste en el batido rítmico de las alas; y 2) la exposición de las glándulas salivales. Estos dos comportamientos sexuales están involucrados en el cortejo (Nation 1989, Gómez Cendra *et al.* 2011) y están asociados con la emisión de feromonas y su dispersión (Arita *et al.* 1989).



Figura 2.3. Cámaras de colecta de volátiles. Cada una contiene 10 machos.

Para estimar la cantidad de feromona liberada por cada tipo de macho se realizaron colectas de volátiles emitidos por los machos ubicados en las cámaras de colecta de volátiles. Cada cámara fue considerada una réplica. Los volátiles se colectaron durante las primeras 3 horas de la mañana, período en el cual los machos liberan la feromona sexual (Teal *et al.* 2000). Mediante un equipo de colecta (Figura 2.4) se hace circular un flujo (400 ml/min) de aire purificado por carbón activado a través de las cámaras que contienen a los machos. El caudal de aire entrante y saliente se controla por medio de medidores de caudal (ARS, FLORIDA, EE.UU.). Los volátiles se capturaron en trampas cilíndricas de vidrio que en su interior contenían 30 mg del adsorbente HayeSep Q (Grace, Deerfield, Illinois, EE.UU.) (Figura 2.5). Luego de la colecta, los compuestos volátiles adsorbidos en las trampas se eluyeron con 200 μ l de cloruro de metileno de grado cromatográfico (Sintorgan[®], Villa Martelli, Buenos Aires) y se almacenaron en viales individuales a -20°C hasta el análisis cromatográfico.

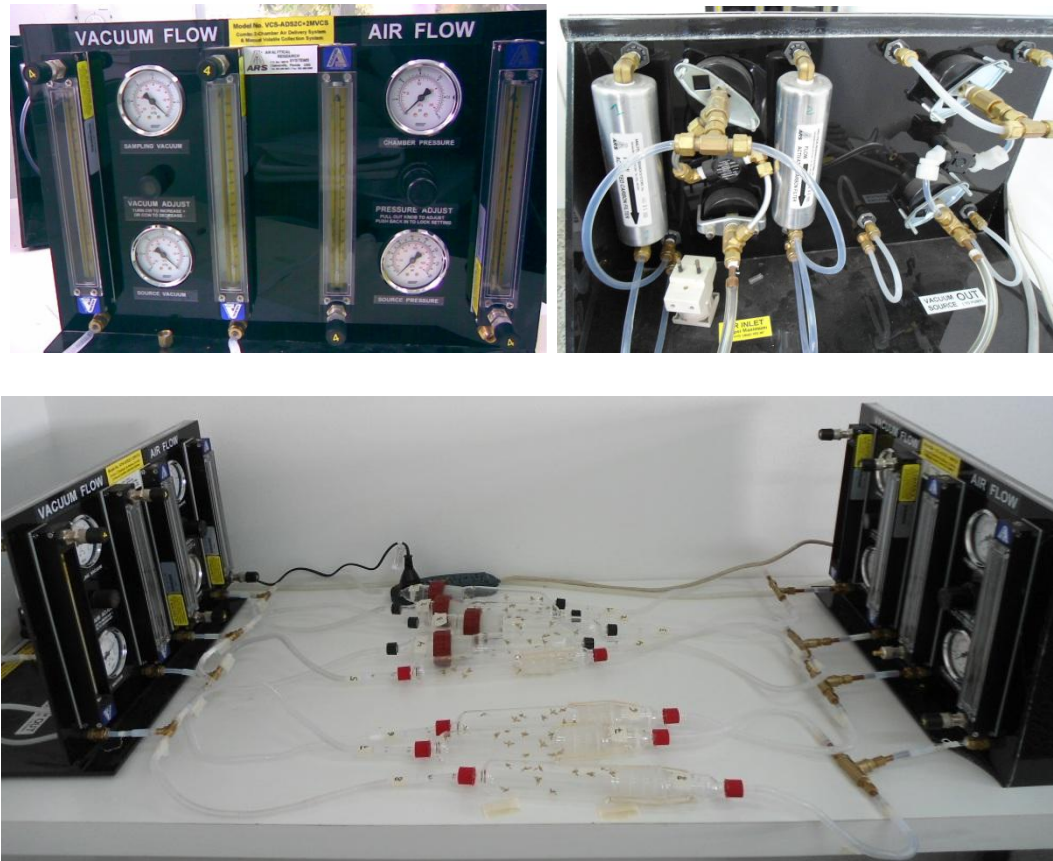


Figura 2.4. Equipo de colecta de volátiles. Arriba (izquierda): parte frontal con los medidores de presión y caudal. Arriba (derecha): parte posterior con los filtros de carbón activado. Abajo: equipo con las cámaras de colecta ya montadas.



Figura 2.5. Trampa de volátiles con el adsorbente HayeSep Q.

Ambas actividades (registro de comportamiento de llamado y de liberación de feromona) se realizaron simultáneamente, utilizando las cámaras de colecta de volátiles (con 10 machos cada una) como cámaras de observación. Se realizaron 4 réplicas con machos silvestres y 3 con machos de laboratorio. Para estimar la emisión de feromonas, se cuantificaron cuatro compuestos característicos de la feromona sexual de *A. fraterculus*

(anastrefina, epianastrefina, suspensolide y (E,E)- α -farneseno) (Cáceres *et al.* 2009, Břízová *et al.* 2013). Para la cuantificación se realizó una curva de calibración externa con farneseno (ver “Análisis de datos”, sección 2.2.4.).

Los eluidos se analizaron mediante un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) y un detector de ionización de llama (GC-FID). Este equipo cuenta con una columna HP-5 (30 m x 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de película). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: se inyectó 1 μ l de cada muestra, con un inyector automático 7693A (Agilent Technologies). Se utilizó el modo “splitless” con el inyector purgado a 30 seg y con nitrógeno como gas portador con un flujo de 27,6 cm/seg. Las temperaturas fueron fijadas con el inyector a 250 $^{\circ}$ C y 300 $^{\circ}$ C en el detector. El ciclo de temperaturas del horno fue: 35 $^{\circ}$ C durante 1 min, luego de 35 $^{\circ}$ C a 100 $^{\circ}$ C a una tasa de 5 $^{\circ}$ C min^{-1} , posteriormente de 100 $^{\circ}$ C a 230 $^{\circ}$ C a una tasa de 12 $^{\circ}$ C min^{-1} y por último el horno se mantuvo a 230 $^{\circ}$ C durante 10 minutos. La identidad de los compuestos estudiados fueron confirmadas por comparación de sus tiempos de retención con los de muestras auténticas obtenidas del “Center for Medical, Agricultural and Veterinary Entomology” (CMAVE) (USDA-ARS, Gainesville, Florida, EE.UU.).

2.2.3. Experimento 3. Efecto de una mezcla artificial de compuestos volátiles sobre el éxito de apareamiento de los machos

El aroma natural de los frutos de guayaba es una compleja mezcla que comprende más de 40 compuestos químicos (Pino *et al.* 1999). En este experimento se evaluó la efectividad de una mezcla artificial de compuestos volátiles presentes en la guayaba (Pino *et al.* 1999, Mahattanatawee *et al.* 2005) para incrementar el éxito de apareamiento de los machos de *A. fraterculus*. Se trató de 7 compuestos sintéticos que pertenecen a diferentes familias químicas: aldehídos (E-2-hexenal), ésteres (etil butanoato y etil hexanoato), monoterpenos (β -mirceno, limoneno, (E)- β -ocimeno) y sesquiterpenos (α -humuleno). Los mismos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (E-2-hexenal, limoneno, β -mirceno, (E)- β -ocimeno y α -humuleno) o sintetizados (etil butanoato y etil hexanoato) en el CMAVE por el Dr. Peter Teal, con una pureza mínima de 98% usando HPLC de fase normal. Mediante un análisis de volátiles de los frutos de guayaba de los sitios de muestreo de la localidad de Horco Molle, Tucumán, se confirmó la presencia de todos los compuestos usados en la mezcla artificial, salvo β -mirceno (Figura 2.6). La mezcla fue preparada mediante la dilución de proporciones iguales de los compuestos en acetona (Sintorgan, Villa Martelli, Buenos Aires) de 99,5% de pureza. La concentración final de cada

compuesto en la mezcla fue 10,0 mg/ml. Un volumen fijo (0,1 ml) de esta mezcla fue colocado sobre un papel de filtro (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) de 5 x 2 cm (Shelly 2001, Kouloussis *et al.* 2013). Una vez que la acetona se evaporó, el papel de filtro se colocó en un contenedor cilíndrico de plástico (3 cm de alto y 2 cm de diámetro) que fue tapado con Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, EE.UU.). El Parafilm se perforó 10 veces con un alfiler entomológico. Este procedimiento fue empleado a fin de obtener una lenta liberación de la mezcla. Grupos de diez machos de 4 días post-emergencia fueron expuestos a la mezcla en un contenedor plástico de 1 L (el mismo que los utilizados para las pruebas de apareamiento) con agua y comida para adultos, durante cuatro días. El preparado con los compuestos fue reemplazado cada dos días. De esta forma, durante esos 4 días cada grupo de diez machos fue expuesto a un total de 2,0 mg de cada compuesto. Un grupo de machos control fueron expuestos solamente a acetona, siguiendo el mismo procedimiento que para los machos expuestos a la mezcla. El éxito de apareamiento fue evaluado tal como se describió anteriormente para el experimento 1. En el presente experimento, las hembras de laboratorio fueron evaluadas con machos de laboratorio y las hembras silvestres con machos silvestres. Se evaluaron un total de 330 arenas experimentales para individuos de laboratorio y 582 para machos silvestres.

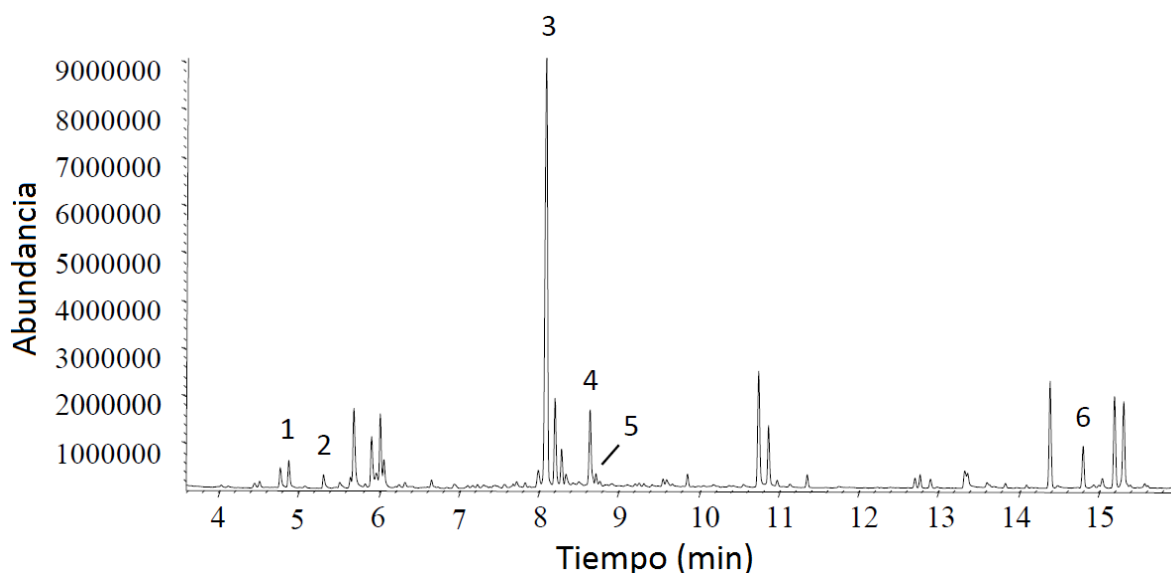


Figura 2.6. Cromatograma de iones totales (TIC) obtenido del análisis de volátiles colectados de frutos de guayaba de la localidad de Horco Molle, Tucumán. La fruta fue cortada en mitades y ubicada en cámaras cilíndricas de vidrio de 0,8 L (40 cm de longitud y 5 cm de diámetro). El procedimiento de recolección de volátiles fue idéntico a los realizados para la recolección de feromonas de machos. Las trampas para volátiles (HayeSep Q) fueron eluidas con 200 μ l de cloruro de metileno y el eluido fue analizado químicamente con un cromatógrafo Agilent 6890 y un detector selectivo de masas Agilent 5973. Los compuestos que se indican en la figura son: (1) etil butanoato, (2) E-2-hexenal, (3) etil hexanoato, (4) limoneno, (5) (E)- β -ocimeno, (6) α -humuleno.

2.2.4. Análisis de datos

En los experimentos 1 y 3, la frecuencia de parejas obtenidas para machos expuestos y no expuestos a guayaba fue comparada por medio de una prueba de bondad de ajuste de G (Zar 1996) corregida por Yates. Todos los análisis se realizaron para machos de laboratorio y machos silvestres separadamente. Los datos de duración y latencia de las cópulas fueron comparadas entre machos expuestos y no expuestos mediante una prueba t de Student.

En el experimento 2, el número de machos realizando los comportamientos “fanning” y de exposición de glándulas salivales así como la estimación de la cantidad de feromonas liberadas fue comparada entre machos expuestos y apareados y machos no expuestos y no apareados mediante un modelo de efecto mixto. Para cada réplica, el número medio de machos realizando un dado comportamiento a través de los intervalos de observación fue usado como variable dependiente, mientras que la condición de exposición (expuesto o no expuesto) fue usada como factor fijo y el origen del macho y el día en el que el ensayo fue realizado como factores aleatorios.

La cantidad de feromona liberada fue estimada como sigue: primero, la cantidad de (E,E)- α -farneseno fue calculada realizando una curva de calibración externa usando estándares sintéticos. Luego, la cantidad de suspensolide, anastrefina y epianastrefina fue calculada relativa a la cantidad de (E,E)- α -farneseno mediante la relación entre el área de suspensolide y el área de (E,E)- α -farneseno dentro de cada cromatograma (el mismo cálculo se realizó para anastrefina y epianastrefina). Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación de Pearson para estudiar posibles correlaciones entre parámetros de comportamiento de llamado sexual de los machos y la emisión de compuestos feromonales.

En todos los casos se comprobaron los supuestos correspondientes a cada prueba estadística (y normalidad para las pruebas de t y normalidad y homocedacia para los ANOVAs).

2.3. Resultados

2.3.1. Experimento 1. Éxito de apareamiento

Los machos expuestos a los volátiles de guayaba lograron significativamente mayor porcentaje de apareamientos que los no expuestos, tanto para machos de laboratorio ($G_y=16,28$; $N=130$; $p<0,001$) como para machos silvestres ($G_y=28,45$; $N=329$; $p<0,001$) (Figura 2.7). Si bien el

tiempo de exposición a la guayaba no fue el mismo entre los diferentes recipientes que contenían a los machos, el tiempo de exposición no estuvo asociado con el éxito de apareamiento (análisis de correlación de Pearson: $r=0,224$; $N=9$; $p=0.562$) por lo cual no afectó el resultado anterior. Los datos de latencia y duración de las cópulas no mostraron diferencias significativas entre machos expuestos y no expuestos, tanto para machos de laboratorio como silvestres (Tabla 2.1).

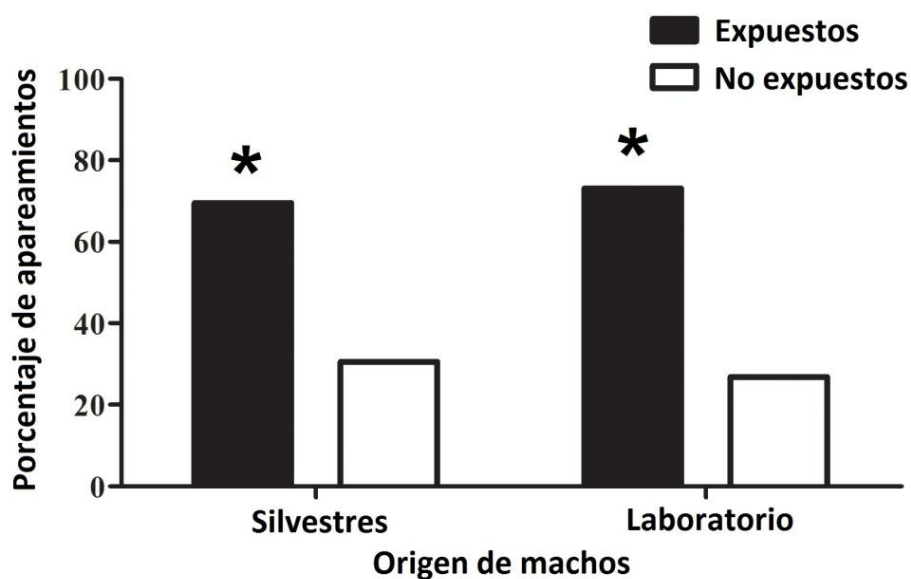


Figura 2.7. Efecto de la exposición a guayaba sobre el éxito de apareamiento de machos y el tiempo de iniciación de cópulas. Porcentaje de apareamientos logrados por machos expuestos y no expuestos a guayaba, para machos de laboratorio y silvestres. Los asteriscos indican diferencias significativas. Se usaron hembras silvestres en todos los casos.

Tabla 2.1. Latencia para la copula y duración de la copula. La tabla muestra los valores promedio de los apareamientos logrados por machos expuestos y no expuestos a guayaba, así como los resultados de la prueba estadística (prueba t de Student).

Origen de macho	LATENCIA						
	Expuestos	N	No Expuestos	N	t	p	gl
Silvestre	27,25 ± 2,08	129	29,58 ± 2,99	59	0,632	0,528	186
Laboratorio	23,86 ± 1,73	57	25,24 ± 3,54	21	0,387	0,700	76

Origen de macho	DURACIÓN						
	Expuestos	N	No Expuestos	N	t	p	gl
Silvestre	65,08 ± 2,55	129	61,53 ± 3,76	59	0,781	0,436	186
Laboratorio	59,09 ± 3,27	57	59,24 ± 5,57	21	0,024	0,981	76

2.3.2. Experimento 2. Comportamiento de llamado y liberación de feromona

El promedio del número de machos realizando el comportamiento de “fanning” fue significativamente mayor para aquellos machos expuestos que lograron aparearse que para los machos no expuestos que no lograron el apareamiento ($F_{1,5}=49,07$; $N=6$; $p<0,001$) (Figura 2.8 a). Para el comportamiento de exposición de glándulas salivales la tendencia fue la misma, pero en este caso las diferencias fueron marginalmente no significativas ($F_{1,5}=5,04$; $N=6$; $p=0,076$) (Figura 2.8 b).

Las cantidades de suspensolide, (E,E)- α -farneseno, anastrefina y epianastrefina registrada mediante los análisis CG-FID fueron siempre mayores para machos expuestos que lograron aparearse (Figura 2.8 c-f). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para todos los compuestos, salvo para (E,E)- α -farneseno (anastrefina: $F_{1,6}=6,80$; $N=7$; $p=0,040$; epianastrefina: $F_{1,6}=13,53$; $N=7$; $p=0,010$; (E,E)- α -farneseno: $F_{1,6}=4,33$; $N=7$; $p=0,083$; suspensolide: $F_{1,6}=9,09$; $N=7$; $p=0,005$). El efecto del origen de los machos (de laboratorio o silvestres) fue despreciable en todos los casos (menos del 1% del total de la varianza). Las correlaciones entre parámetros relacionados al comportamiento de llamado sexual (“fanning”

y exposición de glándulas salivales) y la liberación de compuestos de feromonas fueron significativas en todos los casos, excepto para “fanning” y anastrefina (Tabla 2.2).

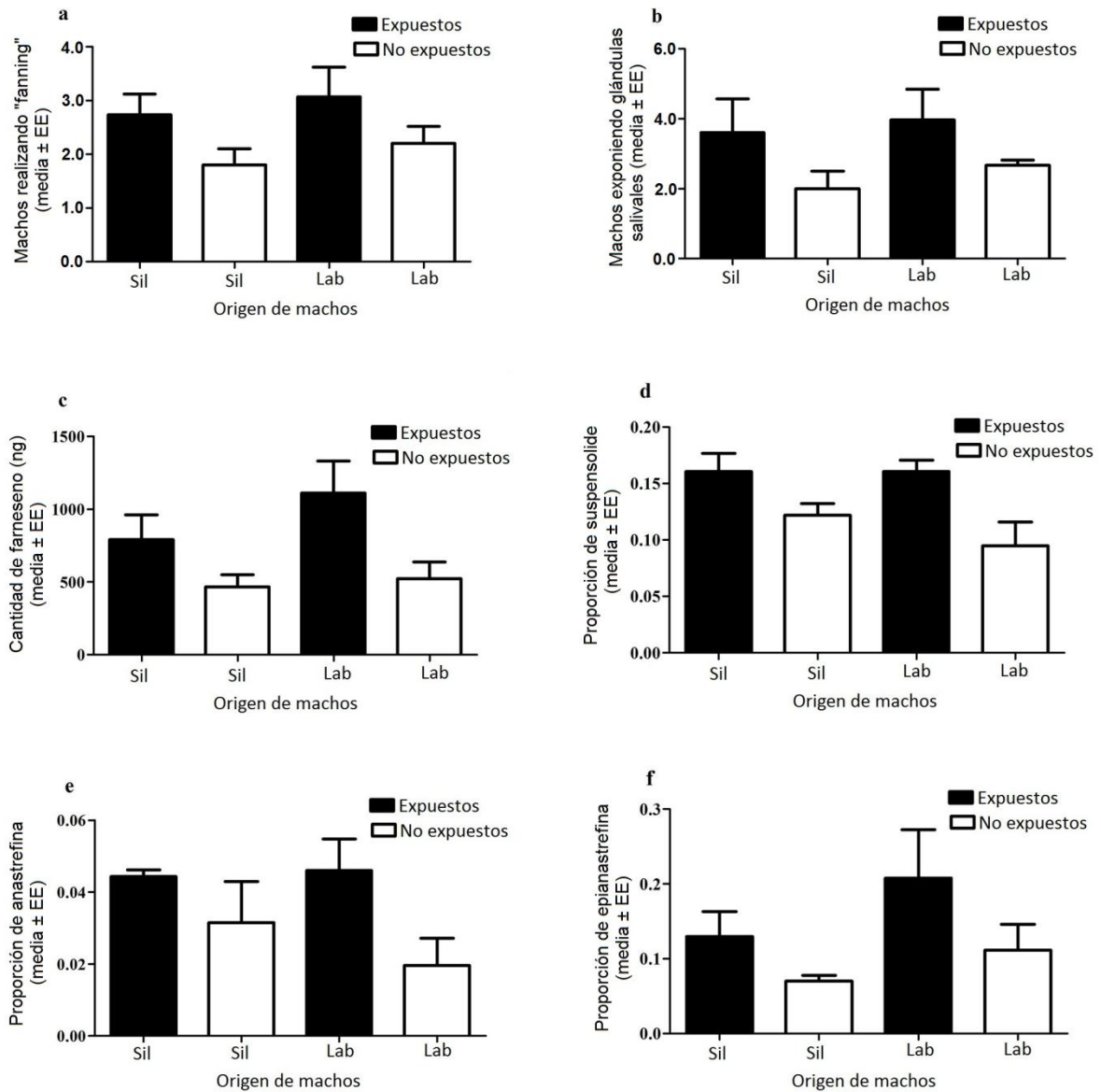


Figura 2.8. Efecto de la exposición a guayaba sobre el comportamiento de llamado sexual y la liberación de compuestos feromonaes de los machos. a) Número promedio de individuos exhibiendo el comportamiento de “fanning” en cada observación (modelo de efectos mixtos $p < 0,001$). **b)** Número promedio de individuos exponiendo sus glándulas salivales en cada observación (modelo de efectos mixtos $p = 0,076$). **c-f)** Estimación de la cantidad de compuestos feromonaes liberados por macho durante 3 horas. La cantidad de suspensolide, anastrefina y epianastrefina fueron estimadas mediante una curva de calibración realizada con (E,E)- α -farneseno.

Tabla 2.2. Valores de correlación entre los parámetros del comportamiento de llamado sexual de machos y los compuestos de feromona analizados.

Comportamiento	ANA	EPI	SUS	FAR
Exposición de glándula	$r=0,57$ $p=0,020$	$r=0,78$ $p<0,001$	$r=0,72$ $p=0,002$	$r=0,72$ $p=0,002$
“Fanning”	$r=0,44$ $p=0,090$	$r=0,75$ $p<0,001$	$r=0,62$ $p=0,010$	$r=0,60$ $p=0,020$

Resultados de análisis de correlación de Pearson. Para cada par de variables se muestra el valor del coeficiente de correlación r y el valor p asociado. $N=16$. Referencias: ANA: anastrefina, EPI: epianastrefina; SUS: suspensolide; FAR: (E,E)- α -farneseno.

2.3.3. Experimento 3. Efecto de una mezcla artificial de compuestos volátiles sobre el éxito de apareamiento de los machos

El número de apareamientos logrados por machos de laboratorio expuestos a la mezcla artificial fue significativamente mayor que los logrados por machos no expuestos ($Gy=7,905$; $N=330$; $p=0,005$) (Figura 2.9). Estos corresponden a un 58,7% de apareamientos para machos expuestos vs. 41,3% para machos no expuestos. Para machos silvestres no se detectaron diferencias en el número de apareamientos logrados por machos expuestos y no expuestos a la mezcla artificial ($Gy=1,809$; $N=582$; $p=0,179$) aunque la tendencia favorece a los machos expuestos (Figura 2.9).



Figura 2.9. Efecto de la exposición a una mezcla artificial sobre el éxito de apareamiento de los machos. Porcentaje de apareamientos obtenidos por machos silvestres y de laboratorio, expuestos y no expuestos a una mezcla artificial consistente en una submuestra de compuestos volátiles liberados por frutos de guayaba ((E)-2-hexenal, β -mirceno, (E)- β -ocimeno, ethyl butanoato, ethyl hexanoato, α -humuleno y limoneno). Los asteriscos indican diferencias significativas entre machos expuestos y no expuestos. Se usaron hembras silvestres con machos silvestres y hembras de laboratorio con machos de laboratorio.

2.4. Discusión

Este estudio confirmó que la exposición a volátiles del fruto de la guayaba incrementa el éxito de apareamiento de los machos de *A. fraterculus*. Además, se evidenció que esta exposición a guayaba afecta parámetros del comportamiento y la fisiología que se encuentran relacionados con el desempeño sexual de los machos. Esto sugiere que la guayaba influye directamente en la competitividad de los machos provocando una alteración a nivel de las señales físicas y químicas relacionadas con la comunicación entre sexos. Además, el incremento en el éxito de apareamiento fue, al menos parcialmente, mimetizado para machos de laboratorio al utilizar una submuestra de compuestos químicos volátiles presentes en la guayaba.

El efecto de los volátiles de la guayaba sobre el éxito de apareamiento de los machos fue evidente tanto para machos silvestres como para machos de laboratorio, siendo ligeramente mayor para estos últimos. De esta forma, los resultados obtenidos por Vera *et al.* (2013) para machos silvestres, se extendieron a machos de laboratorio cuando las hembras involucradas fueron silvestres. En el caso de la mezcla artificial, la respuesta fue evidente sólo para machos de laboratorio. La menor respuesta de machos silvestres podría estar relacionada con una gran variación nutricional del ambiente en el cual se desarrollaron estos individuos

durante su estado larval. Estos individuos fueron obtenidos de frutos de guayaba, un sustrato de desarrollo larval con mayor variabilidad que la dieta artificial de larvas en la cual se desarrollaron los individuos de laboratorio. Esto podría resultar en una mayor diferencia intraespecífica en el estado nutricional de los machos y en una mayor variabilidad en el tamaño de los individuos, lo cual se ha demostrado que posee un impacto en el éxito de apareamiento (Sciurano et al. 2007). Alternativamente, se podría proponer que los machos silvestres son naturalmente más competitivos que los machos de laboratorio (Bosa et al. 2014) y el margen de mejoramiento por exposición a volátiles de guayaba es más estrecho.

Aunque en el experimento 1, las latencias para los apareamientos entre machos expuestos y no expuestos resultaron ser no significativas, las mismas fueron ligeramente inferiores para machos expuestos. Asimismo, los machos silvestres expuestos se aparearon durante mayor tiempo que los no expuestos. Esto sugiere que los machos expuestos podrían presentar alguna característica asociada al cortejo que los hace más atractivos hacia las hembras, ya que estas podrían elegirlos más rápidamente y se aparearían por más tiempo. Sin embargo, las diferencias de latencias y duraciones entre machos expuestos y no expuestos no fueron estadísticamente significativas, por lo que se requieren más estudios para poder verificar estas diferencias.

El efecto de aumento del éxito copulatorio en machos tras la exposición a compuestos provenientes de plantas se ha encontrado en otras especies de tefrítidos (Shelly y Dewire 1994, Papadopoulos *et al.* 2001, Gerofotis *et al.* 2013, Kumaran *et al.* 2013,). No obstante, los mecanismos por los cuales los machos tratados o expuestos a estos compuestos aumentan su éxito copulatorio no han sido analizados. En el caso de la exposición a guayaba, los machos de *A. fraterculus* mostraron estar más activos sexualmente (tanto a nivel comportamental como a nivel de liberación de feromona) tras la exposición a los volátiles de esta fruta. Kumaran *et al.* (2013 y 2014b) mostraron que la composición de la feromona de los machos de *B. tryoni* cambia luego de la ingesta de cuelure y zingerone. Estos autores sugieren que en *B. tryoni* ocurren cambios fisiológicos complejos, que no solo están asociados al sistema de producción y liberación de feromonas sino también a un aumento en la actividad fisiológica de los machos, sugiriendo que el incremento en el éxito copulatorio de los machos no está gobernado solamente por una preferencia de las hembras, sino también por mecanismos de competitividad en los machos. Del mismo modo, Shelly (2001) y más tarde Papadopoulos *et al.* (2006) observaron que los machos de *C. capitata* expuestos al aceite de la raíz del jengibre realizaban más llamados que los machos no expuestos, pero las hembras fueron atraídas de manera similar a las feromonas liberadas por ambos tipos de macho, lo que sugiere que

podrían ser necesarios otros estímulos para activar la preferencia de apareamiento de las hembras. Tal como fue mostrado por Kumaran *et al.* (2013) para *B. tryoni*, la exposición a guayaba de *A. fraterculus* afectó la emisión de señales químicas (feromona) y físicas (“fanning” y exposición de glándulas salivales). Sin embargo, el hecho de que las feromonas fueron muestreadas de un grupo de machos (y no individualmente) impide determinar si el efecto de la exposición a guayaba provoca que todos los machos logren un moderado aumento en la cantidad de feromonas liberada, o bien provoca que sólo algunos de los machos alcancen cantidades de feromonas mucho mayores al promedio. En este sentido, coleccionar feromona de machos individuales podría ayudar a responder esta pregunta. Del mismo modo, observaciones del comportamiento de hembras (o de su respuesta electrofisiológica) ante feromonas podría mejorar nuestro conocimiento acerca de los mecanismos que subyacen al efecto de los volátiles de guayaba sobre la reproducción en *A. fraterculus*.

Es importante destacar que el comportamiento sexual y la liberación de feromonas fueron siempre evaluados un día posterior al ensayo de apareamiento, ya que no es posible realizar el ensayo de apareamiento y la colecta de feromona en un mismo día (debido a la estrecha ventana temporal en la que se da el cortejo y el apareamiento, aproximadamente 2 horas). Para *Anastrepha suspensa* (Loew), Teal *et al.* (2000) mostraron que machos jóvenes (6-7 días) que ya se habían apareado producían mayores cantidades de feromona que machos vírgenes de la misma edad, pero esta diferencia desaparecía cuando alcanzaban los 9 días de edad. En nuestros ensayos de colectas de feromona, los machos evaluados siempre fueron mayores a 10 días, por lo tanto las diferencias entre machos expuestos y no expuestos en cuanto a la producción de feromona difícilmente estaría relacionado con el estado de apareamiento. Esto apoya la idea de que el incremento de la emisión de feromonas está relacionado a la exposición a volátiles de guayaba.

En términos aplicados y considerando la posibilidad de utilizar estos conocimientos para su aplicación en la TIE, el uso de frutos de guayaba no es factible teniendo en consideración la escala deseada de producción de machos estériles. Para esto es un requisito el desarrollo de una mezcla sintética que incluya los compuestos clave presentes en el fruto. De manera similar a lo que fue encontrado por Kouloussis *et al.* (2013) para *C. capitata*, los machos de *A. fraterculus* expuestos a una mezcla artificial basada en compuestos presentes en los volátiles de guayaba lograron aproximadamente un 60% de los apareamientos registrados cuando fueron puestos a competir con machos no expuestos. Este resultado invita a realizar estudios que involucren a machos de cría masiva irradiados y, por otro lado, a identificar los ingredientes activos en la mezcla y sus proporciones en una mezcla optimizada para lograr un

máximo efecto de mejora de la competitividad de apareamiento de los machos y ser transferido a escala masiva.

2.5. Referencias

- Allinghi A, Calcagno G, Petit-Marty N, Gómez Cendra P, Segura D, Vera T, et al. 2007. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. *Florida Entomologist*. 90(1): 27–32.
- Bernays EA, Chapman RF. 1994. En: Host Plant Selection by Phytophagous Insects. Ed. Chapman y Hall. New York.
- Bosa CF, Cruz-López L, Zepeda-Cisneros CS, Valle-Mora J, Guillén-Navarro K y Liedo P. 2014. Sexual behavior and male volatile compounds in wild and mass-reared strains of the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) held under different colony management regimes. *Insect Sci*. doi: 10.1111/1744-7917.12180
- Briceño D, Eberhard WG y Shelly TE. 2007. Male courtship behavior in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) that have received aromatherapy with ginger root oil. *Florida Entomologist*. 90:175–179
- Břízová R, Mendonça AL, Vanícková L, Mendonça AL, Da Silva CE, Tomčala A, et al. 2013. Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Florida Entomologist*. 96: 1107–1115.
- Burk T. 1981. Signalling and sex in acalypterate flies. *Florida Entomologist*. 66: 30–43.
- Cáceres C, Segura DF, Vera MT, Wornoapayorn V, Cladera JL, Teal P, et al. 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of the Linnean Society*. 97: 152–165.
- Cayol JP. 2000. Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by mass-rearing processes. En: Aluja M, Norrbom AL, editors. Fruit flies (Tephritidae): *phylogeny and evolution of behavior*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 843–860.
- Diaz-Fleisher F y Aluja M. 2000. Behavior of Tephritid flies: A Historical Perspective. En: *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. CRC, Washington, DC. 39–72.
- Enkerlin WR. 2005. Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique. En: *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. IAEA. Springer. The Netherlands. 651–676.
- Gerofotis CD, Ioannou CS y Papadopoulos NT. 2013. Aromatized to Find Mates: a-Pinene Aroma Boosts the Mating Success of Adult Olive Fruit Flies. *PLoS ONE*. 8(11): e81336.
- Gómez Cendra P, Calcagno G, Belluscio L y Vilardi JC. 2011. Male courtship behavior of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, from an Argentinean laboratory strain. *Journal of Insect Science*. 11: 175.
- Jaldo HE, Gramajo C y Willink E. 2001. Mass rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): a preliminary strategy. *Florida Entomologist*. 84: 716–718.
- Jaldo HE, Willink E y Liedo P. 2007. Demographic analysis of mass-reared *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Tucumán, Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. 84: 15–20.
- Jaldo HE. 2001. Estudios biológicos y poblacionales de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Kouloussis NA, Katsoyannos BI, Papadopoulos NT, Ioannou CS y Iliadis IV. 2013. Enhanced mating competitiveness of *Ceratitis capitata* males following exposure to citrus compounds. *Journal of Applied Entomology*. 137 (1): 30–38.
- Kumaran N, Balagawi S, Schutze MK y Clarke AR. 2013. Evolution of lure response in tephritid fruit flies: phytochemicals as drivers of sexual selection. *Animal Behaviour*. 85: 781–789.
- Kumaran N, Hayes RA y Clarke AR. 2014a. Cuelure but not zingerone make the sex pheromone of male *Bactrocera tryoni* (Tephritidae: Diptera) more attractive to females. *Journal of Insect Physiology*. doi: 10.1016/j.jinsphys.2014.06.015

- Kumaran N, Prentis PJ, Mangalam KP, Schutze MK y Clarke AR.** 2014b. Sexual selection in true fruit flies (Diptera: Tephritidae): transcriptome and experimental evidences for phytochemicals increasing male competitive ability. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/mec.12880
- Landolt PJ y Phillip TW.** 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*. 42: 371–91. PMID: 15012318
- Liendo MC, Devescovi F, Bachmann GE, Utgés ME, Abraham S, Vera MT, et al.** 2013. Precocious sexual signalling and mating in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males achieved through juvenile hormone treatment and protein supplements. *Bulletin of Entomological Research*. 103(1): 1–13. doi: 10.1017/S0007485312000442 PMID: 22929968
- Lux SA, Vilardi JC, Liedo P, Gaggi K, Calcagno GE, Munyiri FN, et al.** 2002. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomologist*. 85: 102–112.
- Mahattanatawee K, Goodner KL y Baldwin EA.** 2005. Volatile constituents and character impact compounds of selected florida's tropical fruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 118: 414–418.
- McInnis DO, Lance DR y Jackson CG.** 1996. Behavioral resistance to the sterile insect technique by mediterranean fruit fly (diptera: tephritidae) in Hawaii. *Annals of the Entomological Society of America*. 89: 739–744.
- Nation JL.** 1989. The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies. En: *World crop pests: fruit flies, their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam. pp. 189–205.
- Nishida R, Shelly TE y Kaneshiro KY.** 1997. Acquisition of female attractive fragrance by males of the oriental fruit fly from a Hawaiian lei flower, *Fagraea berteriana*. *Journal of Chemical Ecology*. 23: 2275–2285.
- Papadopoulos NT, Katsoyannos BL, Kouloussis NA y Hendrichs J.** 2001. Effect of orange peel substances on mating competitiveness of male *Ceratitidis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 99: 253–261.
- Papadopoulos NT, Shelly TE, Niyazi N y Jang E.** 2006. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior*. 19: 403–418.
- Petit-Marty N, Vera MT, Calcagno G, Cladera JL, Segura DF, Allinghi A, et al.** 2004. Sexual behavior and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*. 97: 1320–1327.
- Pino JA, Ortega A y Rosado A.** 1999. Volatile constituents of guava fruits from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 11(5) 623–629.
- Prokopy RJ, Bennett EW y Bush GL.** 1971. Mating behavior in *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae). *The Canadian Entomologist*. 103: 1405–1409.
- Prokopy RJ y Hendrichs J.** 1979. Mating behavior of *Ceratitidis capitata* on a field-caged host tree. *Annals of the Entomological Society of America*. 72: 642–648.
- Prokopy RJ.** 1980. Mating behavior of frugivorous Tephritidae in nature. *Proc of the International Congress of Entomol Symposium of Fruit Fly Problems*. 16: 37–46.
- Reddy GVP y Guerrero A.** 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends Plant Science*. 9: 253–261. PMID: 15130551
- Rull J, Brunel O y Méndez ME.** 2005. Mass rearing history negatively affects mating success of male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) reared for sterile insect technique programs. *Journal of Economic Entomology*. 98: 1510–1516. PMID: 16334318
- Schoonhoven LM, van Loon JJA y Dicke M.** 2005. *Insect-Plant Biology*. 2nd ed. U.K: Unibooks. Oxford University Press.
- Sciurano RB, Segura DF, Rodriguero M, Gómez Cendra P, Allinghi A, Cladera JL, et al.** 2007. Sexual selection on multivariate phenotype in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Florida Entomologist*. 90: 163–170.
- Segura DF, Petit-Marty N, Sciurano RB, Vera MT, Calcagno G, Allinghi A, et al.** 2007. Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 90: 154–162.
- Segura DF, Cáceres C, Vera MT, Wornoyaporn V, Islam A, Teal PEA, et al.** 2009. Enhancing mating performance after juvenile hormone treatment in *Anastrepha fraterculus*: a differential response in males and females acts as a physiological sexing system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 131(1): 75–84.

- Segura DF, Utgés ME, Liendo MC, Rodríguez MC, Devescovi F, Vera M, et al.** 2013. Methoprene treatment reduces the pre-copulatory period in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 19–29.
- Shelly TE y Kaneshiro KI.** 1991. Lek behavior of the oriental fruit fly in Hawaii. *Journal of Insect Behavior*. 4: 235–241.
- Shelly TE y Dewire AM.** 1994. Chemically mediated success in male Oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 375–382.
- Shelly TE.** 2001. Exposure to alpha-copaene and alpha-copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 94: 497–502.
- Shelly TE y McInnis DO.** 2001. Exposure to ginger root oil enhances mating success of irradiated, mass-reared males of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 94: 1413–1418. PMID:
- Shelly TE y Villalobos E.** 2004. Host plant influence on the mating success of male Mediterranean fruit flies: variable effects within and between individual plants. *Animal Behaviour*. 68: 417–426.
- Shelly TE, Edu J, Pahio E y Nishimoto J.** 2007. Scented males and choosy females: does male odor influence female mate choice in the Mediterranean fruit fly? *Journal of Chemical Ecology*. 33: 2308–2324. PMID:1803053
- Shelly TE, Cowan AN, Edu J y Pahio E.** 2008. Mating success of male Mediterranean fruit flies following exposure to two sources of α -copaene, manuka oil and mango. *Florida Entomologist*. 91: 9–15.
- Tan KH y Nishida R.** 1996. Sex pheromone and mating competition after methyl eugenol consumption in the *Bactrocera dorsalis* complex. En: *Fruit fly pests—a world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray, FL USA. 147–153.
- Teal PEA, Gómez-Simuta Y y Proveaux AT.** 2000. Mating experience and juvenile hormone enhance sexual signalling and mating in male Caribbean fruit flies. *PNAS*. 97: 3708–3712. PMID: 10706642
- Thornhill R y Alcock J.** 1983. The evolution of insect mating system. Cambridge: Harvard University Press.
- Vera MT, Cáceres C, Wornoyaporn V, Islam A, Robinson AS, de la Vega MH, et al.** 2006. Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 99: 387–397.
- Vera MT, Abraham S, Oviedo A y Willink E.** 2007. Demographic and quality control parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) artificial rearing. *Florida Entomologist*. 90: 53–57.
- Vera MT, Ruiz MJ, Oviedo A, Abraham S, Mendoza M, Segura DF, et al.** 2013. Fruit compounds affect male sexual competitiveness in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 2–10.
- Zar J.** 1996. Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, NJ, USA, Prentice-Hall.

Capítulo 3

Caracterización química y sensorial de perfiles químicos de machos de
Anastrepha fraterculus expuestos a compuestos
volátiles del fruto de guayaba

3.1. Introducción

El mejoramiento del éxito de apareamiento de machos de moscas de los frutos de la familia Tephritidae por medio de la exposición a compuestos de origen vegetal es un fenómeno muy conocido en los géneros *Bactrocera* y *Ceratitis*. En *Anastrepha*, este fenómeno está recién comenzando a estudiarse. En especies del género *Bactrocera* el mecanismo de mejoramiento de los machos parece estar relacionado con la ingesta de compuestos precursores de feromonas sexuales (como el metil eugenol, cuelure y zingerone) que mejoran la calidad de la feromona liberada y por lo tanto atraen la atención de más hembras (Shelly y Villalobos 1995, Shelly 2000, Ji *et al.* 2013, Kumaran *et al.* 2013). Muchos de estos compuestos se encuentran presentes en la naturaleza en estructuras vegetales tales como flores, frutos, ramas y tallos, y provocan la atracción de machos hacia esas fuentes, en las cuales los consumen. En cambio, en *Ceratitis capitata*, los machos son fuertemente atraídos a la piel de frutos de naranjas y a la corteza del árbol de guayaba (Katsoyannos *et al.* 1997, Shelly y Villalobos 2004, Papadopoulos *et al.* 2006) pero quedan en las proximidades de esas fuentes sin una evidente ingesta de sustancias. Esto se ve respaldado por muchos estudios que demuestran que en *C. capitata*, la exposición a determinados compuestos obtenidos de plantas (o a las fuentes de los mismos), sin contacto físico, provoca un mejoramiento del éxito de apareamiento de los machos. Entre las fuentes de origen natural que potencian a los machos de *C. capitata* (incrementando su éxito de apareamiento) por medio de la exposición a sus volátiles se puede mencionar al aceite de la raíz del jengibre (ARJ) (Shelly y McInnis 2001, Shelly *et al.* 2003, 2004b, 2007b), aceite de cáscara de naranja u otros cítricos (Shelly *et al.* 2004a, 2008) y mezclas de compuestos de cítricos (Kouloussis *et al.* 2013). Todas estas fuentes poseen sesquiterpenos. En particular, ha sido muy estudiado el sesquiterpeno α -copeno. Shelly (2001) observó el efecto de potenciación de machos de *C. capitata* cuando los expuso únicamente a este compuesto, que a su vez es un fuerte atrayente de machos (Flath *et al.* 1994a,b). Por esta razón, el α -copeno ha sido postulado como uno de los compuestos responsables de la potenciación del apareamiento en machos de *C. capitata* cuando se los expone a las fuentes naturales (Shelly y McInnis 2001, Papadopoulos *et al.* 2006). En *C. capitata*, el efecto potenciador del éxito de apareamiento en los machos tras la exposición a ARJ es tan fuerte que actualmente es utilizado en el manejo de la plaga a través de la Técnica del Insecto Estéril (Dyck *et al.* 2005, Morelli *et al.* 2013, Morató *et al.* 2015) en Australia, Brasil, España, EE-UU, Guatemala, Israel, México y Portugal, (Pereira *et al.* 2011). A este fenómeno potenciador del éxito de apareamiento de los machos a gran escala se lo conoce "aromaterapia" (Shelly *et al.* 2004b, 2007b, Shelly 2008).

En la familia Tephritidae se sabe poco acerca de los cambios producidos en machos debidos a la exposición a volátiles que aumentan su probabilidad de apareamiento (Papadopoulos *et al.* 2008, Kouloussis *et al.* 2013). Uno de los pocos trabajos en el que abordan esta temática es el de Shelly *et al.* (2007a) en el que pone a prueba la hipótesis de que la exposición al ARJ provoca un efecto de perfumado en los machos que los hace más atractivos para las hembras. Esta hipótesis fue postulada sobre la base de resultados previos que demostraron que si bien la exposición a ARJ provoca un incremento en la actividad de llamado sexual de los machos, las hembras fueron igualmente atraídas a la feromona de machos expuestos que a la de machos no expuestos (Shelly y McInnis 2001, Papadopoulos *et al.* 2006). Shelly *et al.* (2007a) utilizaron un diseño experimental en el que evaluaron señales de corto alcance y encontraron que las hembras fueron más atraídas a machos muertos que habían sido expuestos al ARJ cuando estaban vivos que a machos muertos que no habían sido expuestos. Esta orientación preferencial ocurrió aún cuando a las hembras se les impidió el contacto físico y visual con los machos y, reforzando la existencia de un efecto de perfumado, cuando las antenas de las hembras fueron escindidas la preferencia desapareció. A raíz de estos resultados, los autores hipotetizaron que los compuestos volátiles que los machos adquieren en su cutícula tras la exposición al ARJ son los responsables de la atracción de las hembras, por lo que utilizaron hexano para realizar lavados cuticulares de los machos y así extraer los compuestos de sus cutículas. Luego de la extracción de los compuestos las hembras ya no fueron más atraídas a machos expuestos y, a su vez, al transferir las extracciones de los compuestos de machos expuestos a machos no expuestos incrementó la atracción de las hembras para este tipo de macho. Esto sugiere que los compuestos responsables de la atracción de las hembras fueron extraídos de los cuerpos de los machos con hexano. Los autores llamaron a este fenómeno “efecto perfume”, en el cual las hembras son atraídas a ciertos compuestos de los machos mediante señales de corto alcance, como puede ocurrir en el contexto de un lek. En otro trabajo se encontró que los machos de *C. capitata* capturados como adultos de la naturaleza tenían mayor concentración de compuestos como el α -copeno y que una vez extraídos del cuerpo de los machos mediante lavados cuticulares, atrajeron más hembras que los extractos de machos de laboratorio (Mavraganis *et al.* 2008). Esto estaría indicando que en la naturaleza los machos adultos pueden explotar fuentes de compuestos que les confieren aromas particulares que atraen a las hembras.

En el género *Anastrepha* son escasos los trabajos en los que se ha estudiado el éxito reproductivo de los machos tras la exposición a compuestos de origen vegetal. Se ha observado que los machos de *A. serpentina* expuestos a volátiles del ARJ fueron seleccionados

preferencialmente por las hembras para el apareamiento (Flores *et al.* 2011) y que los machos de *A. fraterculus* expuestos a volátiles de guayaba son los preferidos por las hembras (Vera *et al.* 2013, Capítulo 2 de la presente tesis). En el caso más reciente se observó que la exposición de machos de *A. ludens* a volátiles de pomelos (pero no de naranjas) provocó una mayor aceptación por parte de las hembras (Morató *et al.* 2015). Sin embargo, al igual que en *Ceratitis*, en el género *Anastrepha* existe una falta de conocimiento acerca de los mecanismos que provocan este mejoramiento del éxito de apareamiento. Particularmente, se desconoce si el mecanismo estaría relacionado con la incorporación de volátiles que actuarían como precursores de feromonas sexuales, o bien se relaciona con un “efecto perfume” como el propuesto por Shelly *et al.* (2007a) con *C. capitata* y el ARJ, mediante el cual ciertos compuestos quedarían adheridos a la cutícula y serían detectados por las hembras.

En este capítulo se examina la posibilidad de que la preferencia de las hembras de *A. fraterculus* por machos expuestos a guayaba esté mediada por un “efecto perfume”, por el cual el aroma de la guayaba altera la composición química de la cutícula de los machos de tal forma que las hembras puedan distinguir entre individuos expuestos y no expuestos. En primera instancia se verificará que los machos a utilizar en los siguientes experimentos vean mejorado su éxito de apareamiento seguido de la exposición a volátiles del futo de la guayaba. Luego, sabiendo que los machos expuestos resultan ser más atractivos para las hembras se buscará, mediante cromatografía gaseosa, posibles diferencias entre el perfil químico de la cutícula de machos expuestos y no expuestos que podrían explicar el fenómeno de elección por parte de las hembras a través de un efecto de perfumado del macho. Este cambio en la composición química de la cutícula podría también provocar cambios en los volátiles que emiten los machos. Por lo tanto, se comparará tanto el perfil químico de la cutícula como el de los volátiles emitidos entre machos expuestos y machos no expuestos a guayaba. Por último, se investigará si las hembras son capaces de detectar esas diferencias químicas entre ambos tipos de macho haciendo uso de técnicas de electroantenodetección y electroantenodetección acoplada a cromatografía gaseosa.

3.1.1. Objetivos

Objetivo general

Determinar si el incremento del éxito de apareamiento de los machos expuestos a volátiles del fruto de la guayaba se debe a un cambio cualitativo de las señales químicas emitidas por el macho durante el cortejo sexual.

Objetivos específicos

- 1- Comparar el perfil químico de los volátiles que emiten los machos expuestos y no expuestos a guayaba.
- 2- Comparar los compuestos que poseen en su cutícula los machos expuestos y no expuestos a guayaba.
- 3- Estudiar la respuesta electroantegráfica de las antenas de hembras ante los volátiles y los compuestos de cutícula (objetivos 1 y 2, respectivamente) obtenidos de machos expuestos y no expuestos a guayaba.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material biológico

Todos los individuos utilizados en los experimentos descritos a continuación provinieron de la cría de laboratorio del IGAEF, INTA, Castelar y fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas (T: 24 ± 2 °C, RH: $70 \pm 10\%$ y un fotoperiodo de luz/oscuridad de 12hs). Las hembras fueron alimentadas con una dieta a base de azúcar, hidrolizado de levadura (MP Biomedicals, San Francisco, California, EE.UU.) e hidrolizado de maíz (ARCOR, Tucumán) con proporciones en peso 4:1:1, respectivamente (Jaldo *et al.* 2001, Vera *et al.* 2007). La dieta de los machos consistió en azúcar y levadura de cerveza (CALSA, Tucumán) con una proporción en peso de 3:1, respectivamente.

3.2.2. Obtención de muestras

Se estudiaron los compuestos volátiles emitidos por los machos durante el llamado sexual y los compuestos que estos poseen en su cutícula y luego se los utilizó en estudios de electroantenedetección con antenas de hembras. Para ello, el primer paso fue la exposición de

los machos a guayaba desde el día 2 al día 6 post-emergencia, siguiendo el mismo procedimiento de exposición que en el Capítulo 2 (sección 2.2.2.). Los frutos de guayaba fueron reemplazados por nuevos el día 4 post-emergencia. Como control se utilizaron machos no expuestos, que fueron mantenidos en salas separadas para prevenir la exposición a volátiles de guayaba. Se propuso como requisito del diseño experimental constatar que la exposición a la guayaba provocara un mayor éxito de apareamiento en los machos expuestos. A tal fin, el día 16 post-emergencia se realizó una prueba de preferencia para el apareamiento consistente de 140 arenas experimentales con 1 macho tratado, 1 macho no tratado y una hembra, todos vírgenes y de 16 días de edad, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el Capítulo 2 (sección 2.2.2.1.). Los machos y hembras involucrados en la prueba de apareamiento fueron descartados y, de ahora en más, los experimentos fueron realizados con individuos vírgenes, remanentes de las jaulas de donde se obtuvieron los individuos involucrados en esta prueba. Entonces, al día siguiente de la prueba de apareamiento se tomaron (al azar) 8 grupos de 10 machos expuestos a guayaba y 8 grupos de 10 machos no expuestos para ser involucrados en colectas de volátiles y extracción de compuestos de cutícula como se describen a continuación. Cada grupo de 10 machos expuestos (o no expuestos) fue considerado una réplica.

3.2.3. Colecta de volátiles

La colecta de volátiles de los machos se realizó siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 2 para la colecta de feromona. Cada grupo de 10 machos fue colocado dentro de una cámara de colecta y sus volátiles fueron colectados en trampas con el adsorbente HayeSep Q (Grace, Deerfield, Illinois, EE.UU.) durante las primeras 3 horas de la mañana, momento en el cual realizan el llamado sexual (Teal *et al.* 2000). Los compuestos volátiles adsorbidos en las trampas fueron eluidos con 200 μ l de cloruro de metileno de grado cromatográfico (Sintorgan®, Villa Martelli, Buenos Aires) conteniendo tridecano (Sigma-Aldrich®) como estándar interno en una concentración de 10 ng/ μ l. Los 8 eluidos de cada tipo de macho (expuesto o no expuesto) se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

3.2.4. Lavado de machos

Una vez concluida la colecta de volátiles, se realizó la extracción de los compuestos que los machos poseen en su cutícula mediante un lavado cuticular. Para ello, los machos fueron

adormecidos con nitrógeno gaseoso e inmediatamente colocados en viales de 2 ml en grupos de 10 (los mismos grupos que los formados para la colecta de volátiles). Luego, a cada vial se agregó 1 ml de hexano de grado cromatográfico (Sintorgan®, Villa Martelli, Buenos Aires) conteniendo tridecano como estándar interno en una concentración de 10 ng/μl. Los individuos se mantuvieron sumergidos en el hexano durante 1 minuto, luego del cual se trasvasó este solvente a otro vial. Los 8 lavados de compuestos de cada tipo de macho (expuesto o no expuesto) se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

3.2.5. Análisis cromatográfico de los volátiles y de los compuestos en cutícula mediante GCxGC/TOF-MS

Las eluciones de las trampas correspondientes a las colectas de volátiles y los lavados de cutícula se analizaron mediante cromatografía de gases en dos dimensiones y un detector de tiempo de vuelo (GCxGC/TOF-MS), utilizando un equipo LECO Pegasus 4D (LECO Corp., St. Joseph, Missouri, EE.UU.), equipado con un criomodulador quad-jet inmóvil. La primera dimensión correspondió a una columna ZB-5MS (28,4 m × 250 μm de diámetro interno × 0.25 μm de espesor de película, J&W Scientific, Folsom, California, EE.UU.) y la segunda dimensión correspondió a una columna BPX-50 (0,925 m × 100 μm de diámetro interno × 0.1 μm de espesor de película, SGE Inc., Austin, Texas, EE.UU.). Se utilizó helio como gas portador con un flujo constante de 1 ml/min. Se inyectó 1 μl de cada muestra, en el modo “splitless”, con un inyector automático HP 7683. Las temperaturas fueron fijadas con el inyector a 260°C en la línea de transferencia y a 220 °C en la fuente de iones. El programa de temperaturas del horno primario (de la primera columna) fue el siguiente: 40°C por 2 min, luego 40-300°C a 5°C/min y por último se mantuvo a 300°C por 10 min mientras que el programa de temperaturas para el horno secundario fue 5°C mayor que el horno primario, operando en el modo “iso-ramping”. El período de modulación, la duración del pulso caliente y el tiempo de enfriamiento entre las etapas fueron fijados a 4, 0,8 y 1,2 seg, respectivamente. El espectrómetro de masas fue operado en el modo de impacto de electrones a 70 eV. La tasa de adquisición de datos fue de 100 Hz (scans/seg) para el rango de masas de 29-400 amu. El voltaje del detector fue 1750 V. El tiempo de purga fue 60 seg con un flujo de 60 ml/min. Los datos se procesaron y se visualizaron en cromatogramas en 2D y 3D con el software LECO ChromaTOF™. Con el fin de determinar los índices de retención de Kovats (Figura 3.1) de los compuestos estudiados, se inyectó un estándar de n-alcenos (C₈-C₂₂; Sigma-Aldrich) con el mismo programa de temperaturas. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus patrones de

fragmentación de espectros de masas e índices de retención de Kovats con datos de fuentes bibliográficas y con estándares auténticos (Sigma-Aldrich). Ante la ausencia de estándares, las identificaciones se realizaron mediante la comparación con la biblioteca de espectros de referencia NIST y registro de datos de espectros de masa Wiley/NBS (McLafferty *et al.* 1989).

$$I = \left[\frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 \times z) + (100 \times n)$$

Figura 3.1. Ecuación utilizada para el cálculo de los índices de Kovats. Referencias. *I*: índice de retención de Kovats; *n*: número de átomos de carbono en el alcano más pequeño; *N*: número de átomos de carbono en el alcano más grande; *z*: diferencia del número de átomos de carbono entre alcano más pequeño y el más grande; *t_r*: tiempo de retención.

Una vez obtenidas las salidas cromatográficas, el primer paso fue comparar visualmente y de manera exhaustiva los cromatogramas de los compuestos volátiles y compuestos de cutícula entre machos expuestos y no expuestos a guayaba con el fin de buscar diferencias cualitativas (presencia/ausencia) de compuestos. En caso de hallar alguna diferencia visual entre cromatogramas se procedió a identificar el compuesto y a calcular sus abundancias relativas.

Luego de la observación visual, y debido a la complejidad de los cromatogramas (con alrededor de dos mil picos cromatográficos detectados por el programa) se seleccionaron 18 compuestos (Tabla 3.1) que fueron cuantificados y comparados entre machos expuestos y no expuestos. Estos son compuestos que se encuentran presentes en el fruto de la guayaba y/o en machos de *A. fraterculus* (Tabla 3.2). También, fueron buscados todos los compuestos que pertenecieron a la mezcla artificial de compuestos volátiles del Capítulo 2, pero 4 de ellos (etil butanoato, E-2-hexenal, etil hexanoato y α -humuleno) no figuran en la lista de los 18 compuestos estudiados debido a que sólo se encontraron trazas o bien no pudieron ser hallados en el cromatograma. Asimismo, el α -copeno fue encontrado como trazas, lo cual imposibilitó su análisis.

Tabla 3.1. Lista de compuestos seleccionados para los análisis en GCxGC/TOF-MS para ser comparados entre machos expuestos y no expuestos.

Nombre abreviado	Nombre completo	Nomenclatura IUPAC	CAS #
HEXE	E-2-hexenol	(2E)-2-Hexen-1-ol	928-95-0
PIN	α -pineno	(1S,5S)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene ((-)- α -Pinene)	80-56-8
MYR	β -mirreno	7-Methyl-3-methylene-1,6-octadiene	123-35-3
CYM	p-cimeno	1-Methyl-4-(1-methylethyl)benzene	99-87-6
HEXA	2-etil hexanol	2-Ethylhexan-1-ol	104-76-7
LIM	limoneno	1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene	138-86-3
OCI	E- β -ocimeno	trans--3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene	502-99-8
NONANAL	nonanal	nonanal	124-19-6
NONE	Z-3-nonenol	(3Z)-3-Nonen-1-ol	10340-23-5
NONA	(E-Z)-3,6-nonadienol	(3E,6Z)-nona-3,6-dien-1-ol	56805-23-3
BER	α -E-bergamoteno	trans-2,6-Dimethyl-6-(4-methylpent-3-enyl)-bicyclo[3.1.1]hept-2-ene	17699-05-7
GERA	geranylacetona	(5E)-6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one	3796-70-1
GERM	germacreno D	(S,1Z,6Z)-8-isopropyl-1-methyl-5-methylenecyclodeca-1,6-diene	37839-63-7
SUS	suspensolide	(E,E)-4,8-Dimethyl-3,8-decadien-10-olide	125002-75-7
ZEFAR	(Z,E)- α -farneseno	(Z,E)-3,7,11-Trimethyl-1,3,6,10-dodecatetraene	26560-14-5
EEFAR	(E,E)- α -farneseno	α : 3,7,11-trimethyl-1,3,6,10-dodecatetraene	502-61-4
ANA	anastrefina	trans-hexahydro-trans-4,7 α -dimethyl-4-vinyl-2-(3H)-benzofuranone	86003-24-9
EPI	epianastrefina	trans-hexahydro-cis-4,7 α -dimethyl-4-vinyl-2-(3H)-benzofuranone	87248-73-5

La nomenclatura IUPAC y el #CAS fueron obtenidos de las fuentes "https://en.wikipedia.org" y "www.pherobase.com".

Tabla 3.2. Tiempos de retención, índices de Kovats y antecedentes de la presencia de los compuestos seleccionados en guayaba y en machos de *A. fraterculus*.

Nombre abreviado	Nombre completo	T. de ret. (1º col.) ^a	T. de ret. (2º col.) ^b	Ind. de Kovats ^c	Ind. de Kovats biblio. ^d	Guayaba ^e	<i>A. fraterculus</i> ^f
HEXE	E-2-hexenol	550	1,600	888	862	Idstein y Schreier 1985	
PIN	α-pineno	626	1,260	938	939	Pino <i>et al.</i> 2001, 2002	Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
MYR	β-mirceno	722	1,320	992	991	Pino <i>et al.</i> 1999, 2001, Mahattanatawee <i>et al.</i> 2005	Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
CYM	p-cymeno	786	1,500	1027	1027	Pino <i>et al.</i> 1999	Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
HEXA	2-etil hexanol	790	1,440	1031	1029		Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
LIM	Limoneno	798	1,380	1035	1036	Pino <i>et al.</i> 1999, 2001, 2002, Diniz Soares <i>et al.</i> 2007	Lima <i>et al.</i> 2001, Cáceres <i>et al.</i> 2009, Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
OCI	E-β-ocimeno	822	1,390	1049	1050	Pino <i>et al.</i> 2001	Cáceres <i>et al.</i> 2009, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
NONANAL	nonanal	930	1,600	1107	1108		Cáceres <i>et al.</i> 2009
NONE	Z-3-nonenol	1014	1,730	1157	nd		Cáceres <i>et al.</i> 2009, Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
NONA	(E-Z)-3,6-nonadienol	1018	1,830	1159	nd		Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
BER	α-E-bergamoteno	1474	1,570	1441	1436		Cáceres <i>et al.</i> 2009, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
GERA	Geranylacetona	1490	1,820	1451	1453		Kalinová 2011, comunicación personal
GERM	Germacreno D	1550	1,730	1490	1490		Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
SUS	Suspensolide	1564	2,210	1499	nd		Lima <i>et al.</i> 2001, Cáceres <i>et al.</i> 2009, Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
ZEFAR	(Z,E)-α-farneseno	1550	1,640	1490	1497		Lima <i>et al.</i> 2001, Cáceres <i>et al.</i> 2009, Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
EEFAR	(E,E)-α-farneseno	1570	1,680	1503	1508		Cáceres <i>et al.</i> 2009, Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
ANA	Anastrefina	1694	2,630	1592	nd		Lima <i>et al.</i> 2001, Cáceres <i>et al.</i> 2009, Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015
EPI	Epianastrefina	1714	2,630	1606	nd		Lima <i>et al.</i> 2001, Cáceres <i>et al.</i> 2009, Břízová <i>et al.</i> 2013, Milet-Pinheiro <i>et al.</i> 2015

Los compuestos se encuentran ordenados según sus tiempos de retención en la primera columna cromatográfica. **a** Tiempo de retención (segundos) en la primera columna cromatográfica. **b** Tiempo de retención (segundos) en la segunda columna cromatográfica. **c** Índice de Kovats para la columna ZB-5MS. **d** Índice de Kovats de fuente externa (www.pherobase.com) para una columna DB5/HP5. **e** Literatura en donde el compuesto fue hallado en guayaba. **f** Literatura en donde el compuesto fue hallado en machos de *A. fraterculus*.

3.2.6. Electroantenografía (EAG)

Con el fin de comparar la respuesta electroantenográfica total de antenas de hembras de *A. fraterculus* entre la mezcla de compuestos volátiles emitidos por los machos expuestos a guayaba y la mezcla de volátiles emitidos por machos no expuestos se realizó un estudio electroantenográfico (EAG). Para este estudio, se cortó la cabeza de una hembra virgen de aproximadamente 7 días, la cual fue montada sobre su base en un capilar de vidrio con solución salina (Malo *et al.* 2005). El extremo distal de una de las antenas fue insertado dentro de otro capilar de vidrio con la misma solución salina y conectado al electrodo de registro (Figura 3.2). La señal producida por la antena fue transmitida a un amplificador NL 1200 (Syntech®, Hilversum, Países Bajos) y transformada a una señal digital mediante el programa computacional EAG2000 (Syntech®). El estímulo fue suministrado mediante pulsos de aire que atravesaban un preparado consistente en una pipeta Pasteur de vidrio la cual contenía en su interior un papel de filtro con 10µl del eluido de volátiles (o extracción de compuestos de cutícula) contenido en un vial. Estos 10 µl corresponden a 0,5 equivalentes macho para los volátiles y a 0,1 equivalentes macho para los lavados de compuestos de cutícula. Luego de colocar la muestra sobre el papel de filtro se esperó 1 min para que se evaporara el solvente y comenzar con los estímulos. Como control se utilizó un preparado con el papel de filtro conteniendo 10 µl del solvente correspondiente (cloruro de metileno para eluidos de volátiles y hexano para lavados de compuestos de cutícula). Cada antena fue estimulada con 10 pulsos de aire (repeticiones) del preparado de machos expuestos, 10 pulsos de aire del preparado de machos no expuestos y 10 pulsos de aire del preparado control. Esto se realizó alternada y sistemáticamente, estimulando la antena con un pulso del preparado control, seguido de un pulso del preparado de machos expuestos y un pulso del preparado de machos no expuestos. Cada estimulación generó una respuesta electroantenográfica (estimada en mili Voltios) que el programa tradujo en una amplitud de respuesta. Las diez mediciones de cada réplica fueron promediadas, obteniendo un total de 8 réplicas para machos expuestos y el mismo número para machos no expuestos (de manera pareada en 8 antenas distintas). El procedimiento aquí descrito para los compuestos volátiles fue también realizado para los lavados cuticulares.

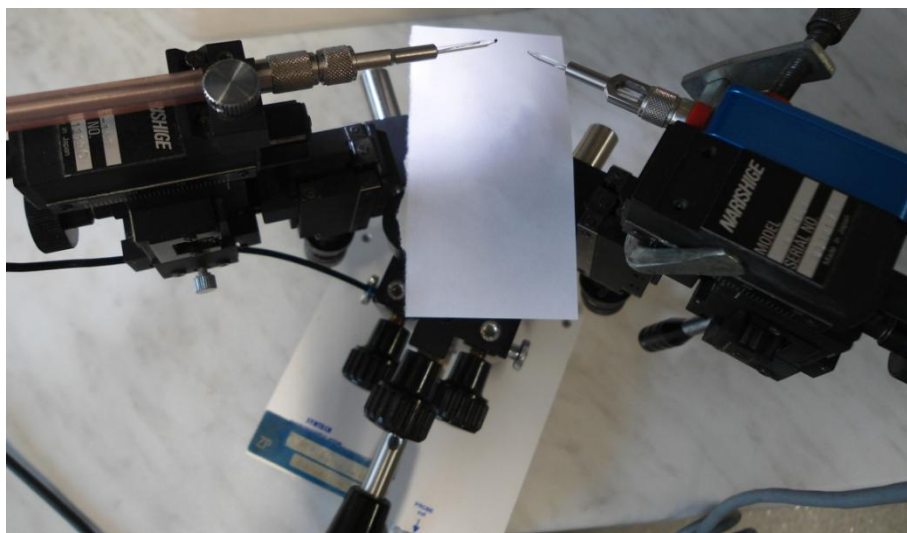


Figura 3.2. Estudio de electroantenodetección. Cabeza de una hembra montada en el capilar con solución salina que a su vez se encuentra inserto en el electrodo de referencia (izquierda). También se observa el segundo capilar con solución salina inserto en el electrodo de registro (derecha).

3.2.7. Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección (GC-EAD)

Con el fin de evaluar la existencia de compuestos (tanto en la colecta de volátiles como en los lavados de cutícula) diferenciales entre machos expuestos y no expuestos que sean capaces de estimular las antenas de las hembras de *A. fraterculus* se realizó un estudio de cromatografía gaseosa acoplado a electroantenodetección. Este estudio permitió también la búsqueda de compuestos potencialmente relevantes para las hembras (que provocan una respuesta en la antena) que pudieran no haberse tenido en cuenta en los análisis cromatográficos (sección 3.2.5).

El equipo utilizado fue un cromatógrafo gaseoso Hewlet-Packard 5890a (CG-FID) equipado con una columna Rxi-5Sil MS (Restek, Bellefonte, Pensilvania, EE.UU.) de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de film. La columna fue dividida en su terminación por un divisor "Graphpack 3D/2 four-arm", permitiendo la división del eluido, por un lado hacia un detector de ionización de llama (FID), y por el otro hacia una salida en donde se encuentra el montaje con la antena de una hembra, similar al realizado para el estudio de electroantenografía (sección 3.2.6). El cromatógrafo fue operado con una temperatura inicial de 40°C durante 2 minutos y luego se estableció una rampa de temperatura a una tasa de 15°C por minuto hasta alcanzar los 270°C de temperatura final, que fue mantenida durante 5 minutos. Las temperaturas del inyector y del detector fueron fijadas a 250 y 270°C, respectivamente. A medida que las muestras abandonaban la columna

cromatográfica estas se dividían y los compuestos se registraban simultáneamente en el FID y en el EAD. Así, para cada compuestos separado por la columna se obtuvo un pico cromatográfico (pico FID) y, si el compuesto fue detectado por la antena, también un pico electroantenográfico (pico EAD) que se visualiza en el mismo tiempo de retención que el pico FID.

Antes de comenzar con este estudio, las 8 muestras correspondientes a eluidos de volátiles de machos expuestos fueron mezcladas conformando una única muestra (réplica), la cual se concentró hasta obtener 0,2 equivalentes macho/ μ l. Lo mismo se realizó para las 8 muestras de machos no expuestos. Una vez montada la antena de la hembra, se inyectaron en el cromatógrafo dos microlitros (0,4 equivalentes macho) de la réplica de machos expuestos. Inmediatamente luego de haber finalizada la corrida cromatográfica, utilizando el mismo montaje de antena, se inyectaron dos microlitros de la réplica de machos no expuestos. Este procedimiento (inyección de la muestra de machos expuestos y de machos no expuestos) fue considerado una repetición. Se alternó el orden de inyección de muestras de machos expuestos y no expuestos entre repeticiones. Sólo se consideraron las respuestas electroantenográficas que fueron observadas consistentemente en al menos 2 antenas distintas. Para cada compuesto que presentó respuesta electroantenográfica se calculó su respuesta relativa según la relación: [respuesta electroantenográfica (mV) / amplitud del pico FID del estándar interno]. Este cálculo estima la intensidad con la que cada compuesto es detectado en la antena y, al estar relativizado al estándar interno, es posible comparar la intensidad de respuesta de cada compuesto entre machos expuestos y no expuestos. Las muestras fueron, a su vez, inyectadas en el GCxGC/TOF-MS, siendo las escalas de tiempo de este equipo y las del GC-EAD similares entre sí. Esto permitió una comparación directa de los compuestos que presentaron actividad electroantenográfica. Los compuestos que provocaron respuestas electroantenográficas fueron caracterizados utilizando índices de retención de Kovats correspondientes al equipo GC-EAD. Para ello, junto con las muestras analizadas se inyectó un estándar de n-alcenos (C_8 - C_{22} ; Sigma-Aldrich) con el mismo programa de temperaturas para poder calcular los índices de retención de los picos registrados por el EAD y compararlos con los índices de retención correspondientes al GCxGC/TOF-MS. Se analizaron todos los compuestos dentro de las áreas delimitadas y se identificó a los compuestos responsables de la actividad electroantenográfica mediante el uso de estándares sintéticos. El mismo procedimiento aquí descrito para los compuestos volátiles fue también realizado para los lavados cuticulares. El número de repeticiones (inyecciones en el GC-EAD) fue de 5 para

volátiles de machos expuestos y no expuestos, y de 4 para lavados de cutícula de machos expuestos y no expuestos.

3.2.8. Análisis de datos

En el análisis cromatográfico por GCxGC/TOF-MS, cada uno de los 18 compuestos fue cuantificado relativizando al estándar interno y promediado entre las 8 réplicas en cada tipo de macho (expuesto o no expuesto). Entonces, cada compuesto fue comparado entre machos expuestos y no expuestos mediante una prueba de t para muestras dependientes. Además se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA) como una alternativa para buscar un patrón entre el perfil químico de machos expuestos y no expuestos a guayaba. En el estudio de EAG, los promedios de las 10 repeticiones de las respuestas electroantenográficas fueron comparados entre machos expuestos y no expuestos mediante una prueba de t para muestras dependientes. Para el estudio de GC-EAD, las respuestas electroantenográficas relativas de cada compuesto, fueron comparadas entre machos expuestos y no expuestos mediante una prueba de t para muestras dependientes. Todos estos análisis fueron realizados tanto para los compuestos volátiles como para los compuestos extraídos de la cutícula de los machos. Por razones experimentales, una de las corridas cromatográficas del análisis por GC-GC/TOF-MS de muestras de volátiles resultó perdida, por lo que el número de réplicas incluido en los análisis estadísticos fue 7. En todos los casos se comprobaron los supuestos correspondientes a cada prueba estadística (y normalidad para las pruebas de t y normalidad y homocedacia para los ANOVAs).

3.3. Resultados

En la prueba de preferencia para el apareamiento se observó un total de 129 cópulas, de las cuales el 64% correspondieron a machos expuestos a guayaba y un 36% a los no expuestos ($G_1=6,583$; $p=0,012$). De esta forma se pudo confirmar que los machos expuestos a guayaba fueron preferidos por las hembras por sobre los machos no expuestos.

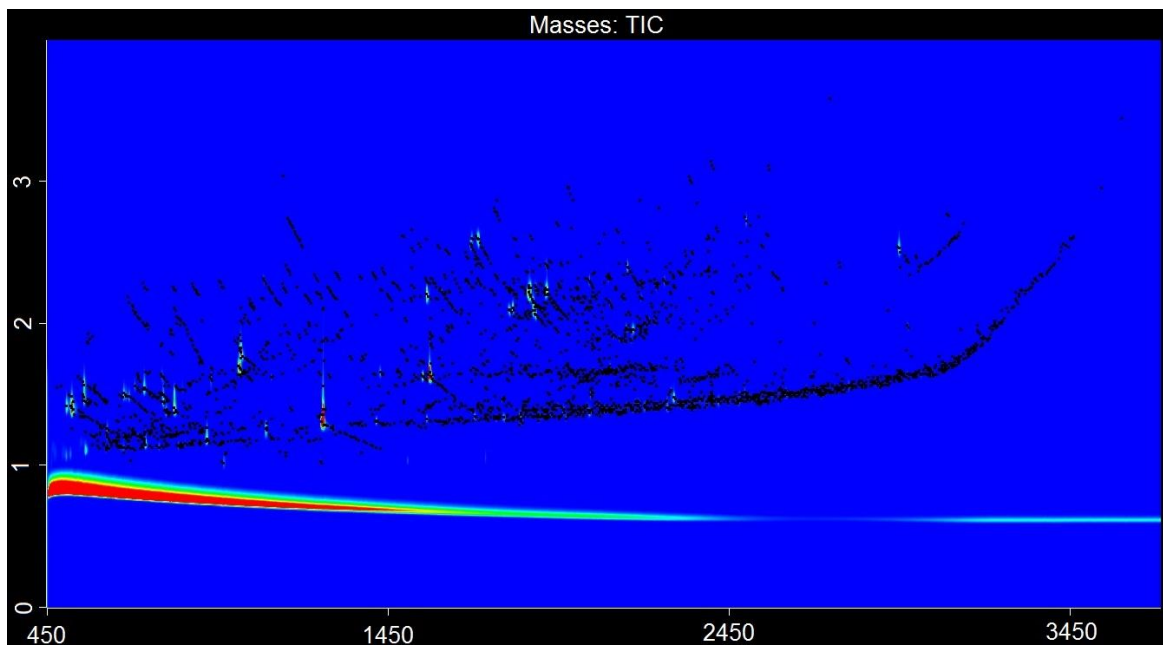
3.3.1. Comparación de volátiles de los machos

3.3.1.1. Análisis por CGxGC/TOF-MS de los volátiles: comparación visual

La Figura 3.3 muestra, a modo de ejemplo, dos cromatogramas correspondientes a los volátiles de machos expuestos y machos no expuestos a guayaba. Al comparar visualmente cuadro por

cuadro los cromatogramas de las 8 réplicas de volátiles de machos expuestos a guayaba con los de los machos no expuestos no se encontraron diferencias apreciables.

a)



b)

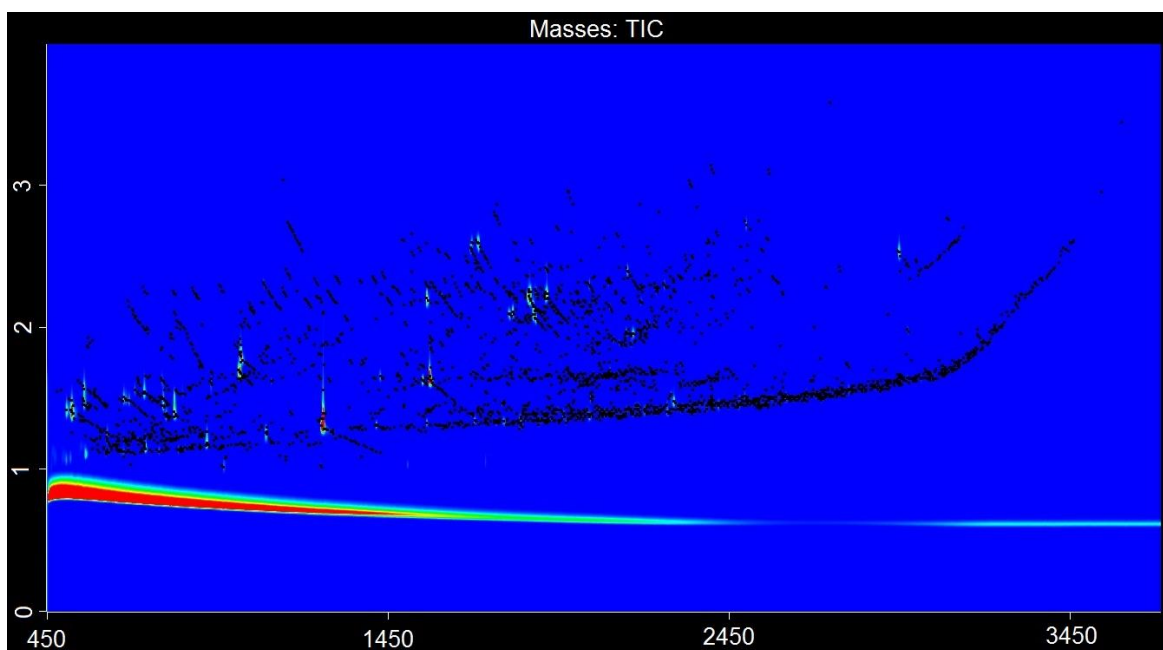


Figura 3.3. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a volátiles de machos, obtenidos mediante el análisis por CGxGC/TOF-MS. a) machos expuestos a guayaba. b) machos no expuestos. Se observa la TIC (Corriente Total de Iones) detectada. En cada cromatograma, el eje horizontal y vertical representan el tiempo de retención correspondiente a la primera y segunda columna cromatográfica (primera y segunda dimensión), respectivamente. Ambos tiempos se encuentran expresados en segundos. Cada punto observable en los cromatogramas corresponde a un pico cromatográfico detectado por el programa. El número de réplicas fue 7 para ambos tipos de macho.

3.3.1.2. Análisis por CGxGC/TOF-MS de los volátiles: comparación cualitativa y cuantitativa de los compuestos estudiados

Las abundancias relativas de los compuestos presentes en ambos tipos de macho no arrojaron diferencias significativas entre machos expuestos y no expuesto cuando se analizaron mediante pruebas t de Student para muestras dependientes (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Comparación cuantitativa de los compuestos seleccionados en machos expuestos y no expuestos a guayaba para los compuestos volátiles.

COMPUESTO	CANTIDAD RELATIVA MEDIA ± EE		t ₆	p
	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS		
HEXE	(2,51 ± 2,52) × 10 ¹	(12,90 ± 9,07) × 10 ¹	1,506	0,182
PIN	(7,37 ± 3,82) × 10 ³	(2,99 ± 0,81) × 10 ³	1,142	0,296
MYR	(3,31 ± 0,82) × 10 ³	(1,86 ± 0,27) × 10 ³	1,933	0,097
CYM	(4,46 ± 2,36) × 10 ³	(1,68 ± 0,25) × 10 ³	1,252	0,256
HEXA	(2,07 ± 0,83) × 10 ⁴	(2,29 ± 0,69) × 10 ⁴	0,572	0,587
LIM	(2,43 ± 0,72) × 10 ⁴	(1,51 ± 0,69) × 10 ⁴	1,209	0,271
OCI	(4,70 ± 1,60) × 10 ⁵	(2,97 ± 0,43) × 10 ⁵	1,176	0,283
NONANAL	(7,86 ± 2,51) × 10 ³	(4,91 ± 1,52) × 10 ³	1,306	0,239
NONE	(3,07 ± 0,51) × 10 ⁵	(2,62 ± 0,39) × 10 ⁵	0,705	0,506
NONA	(2,83 ± 0,66) × 10 ⁵	(2,44 ± 0,41) × 10 ⁵	0,787	0,461
BER	(1,81 ± 0,48) × 10 ³	(1,84 ± 0,34) × 10 ³	0,148	0,886
GERA	(1,35 ± 0,45) × 10 ²	(9,85 ± 2,51) × 10 ²	1,280	0,247
GERM	(2,20 ± 0,40) × 10 ³	(2,40 ± 0,55) × 10 ³	0,486	0,644
SUS	(2,24 ± 0,56) × 10 ⁵	(1,65 ± 0,26) × 10 ⁵	1,266	0,252
ZEFAR	(6,52 ± 1,46) × 10 ⁴	(5,68 ± 0,66) × 10 ⁴	0,772	0,469
EEFAR	(9,11 ± 1,17) × 10 ⁵	(8,71 ± 0,99) × 10 ⁵	0,393	0,707
ANA	(5,76 ± 1,72) × 10 ⁴	(6,47 ± 1,37) × 10 ⁴	0,446	0,671
EPI	(2,67 ± 0,69) × 10 ⁵	(1,86 ± 0,54) × 10 ⁵	1,350	0,225

Se muestra la cantidad relativa media de cada compuesto y los valores t y p correspondientes a pruebas t de Student para muestras dependientes. El número de réplicas fue 7 para cada tipo de macho. El nombre completo de los compuestos se muestra en la Tabla 3.1. El número de réplicas fue 7 para ambos tipos de macho. Referencias. T₆: valor estadístico con grados de libertad igual a 6.

3.3.1.3. Análisis multivariado de los compuestos estudiados

El análisis de componentes principales de volátiles para los compuestos seleccionados mostró que los machos expuestos y los machos no expuestos no forman agrupaciones definidas en el espacio bidimensional correspondiente a los 2 factores que explicaron el 66,11% del total de la varianza. Los correspondientes autovalores fueron 6,19 y 5,71 para los factores 1 y 2, respectivamente (Figura 3.4).

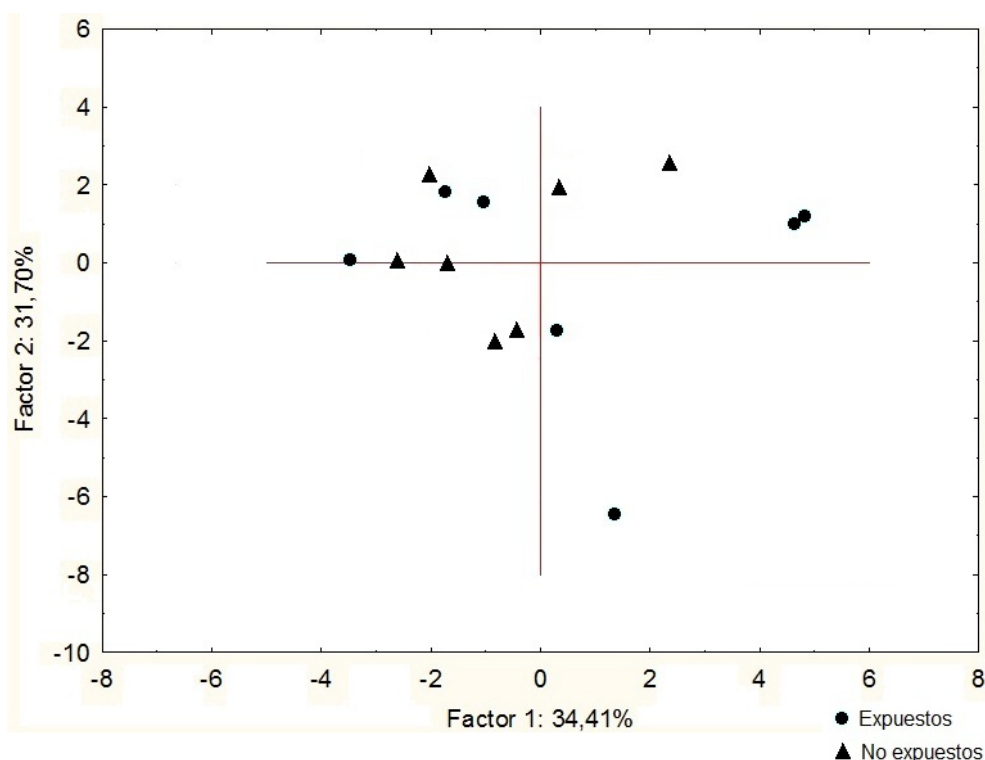


Figura 3.4. Análisis de Componentes Principales para volátiles de machos expuestos y no expuestos a guayaba. Se muestran los dos factores que explican el 66,11% de la varianza entre las muestras. El número de réplicas fue 7 para ambos tipos de macho.

3.3.1.4. Electroantenografía de volátiles de machos

Las respuestas electroantenográficas de las hembras fueron similares cuando se las estimuló con el eluido de compuestos volátiles emitidos por machos expuestos a guayaba y con el eluido de compuestos volátiles emitidos por machos no expuestos ($t_7=0,024$; $p=0,981$) (Figura 3.5).

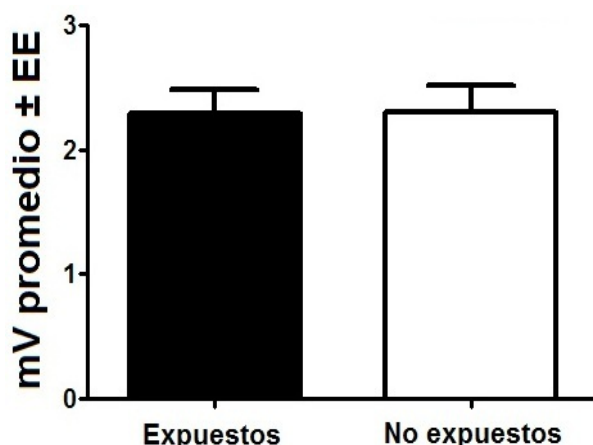


Figura 3.5. Respuesta electroantenográfica de hembras ante la mezcla de compuestos volátiles emitidos por machos expuestos o no expuestos a guayaba. Los valores se expresan en mili Voltios y son el promedio de 10 repeticiones para cada una de las 8 réplicas. Estas 8 réplicas fueron a su vez promediadas para construir el gráfico. Las barras representan el error estándar de la media. Referencias. mV: mili Voltios; EE: error estándar.

3.3.1.5 Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección para volátiles de machos

Las antenas de las hembras presentaron 7 respuestas consistentes (en 2 o más antenas) durante los análisis de CG-EAD en los cuales se utilizaron compuestos volátiles de machos expuestos y no expuestos a guayaba (Figura 3.6). Los compuestos responsables de las respuestas electroantenográficas fueron identificados como: E- β -ocimeno*, Z-3-nonenol, (E-Z)-3,6-nonadienol, germacrenoD*, (Z,E)- α -farneseno*, (E,E)- α -farneseno y epianastrefina. La identidad de los compuestos seguidos de un asterisco se encuentra basada en cálculos de índices de Kovats, ya que no se dispuso de estándares para estos compuestos. Las pruebas t de Student no arrojaron diferencias significativas para la respuesta relativa media de cada uno de los 7 compuestos, comparada entre machos expuestos a guayaba y machos no expuestos (Tabla 3.4).

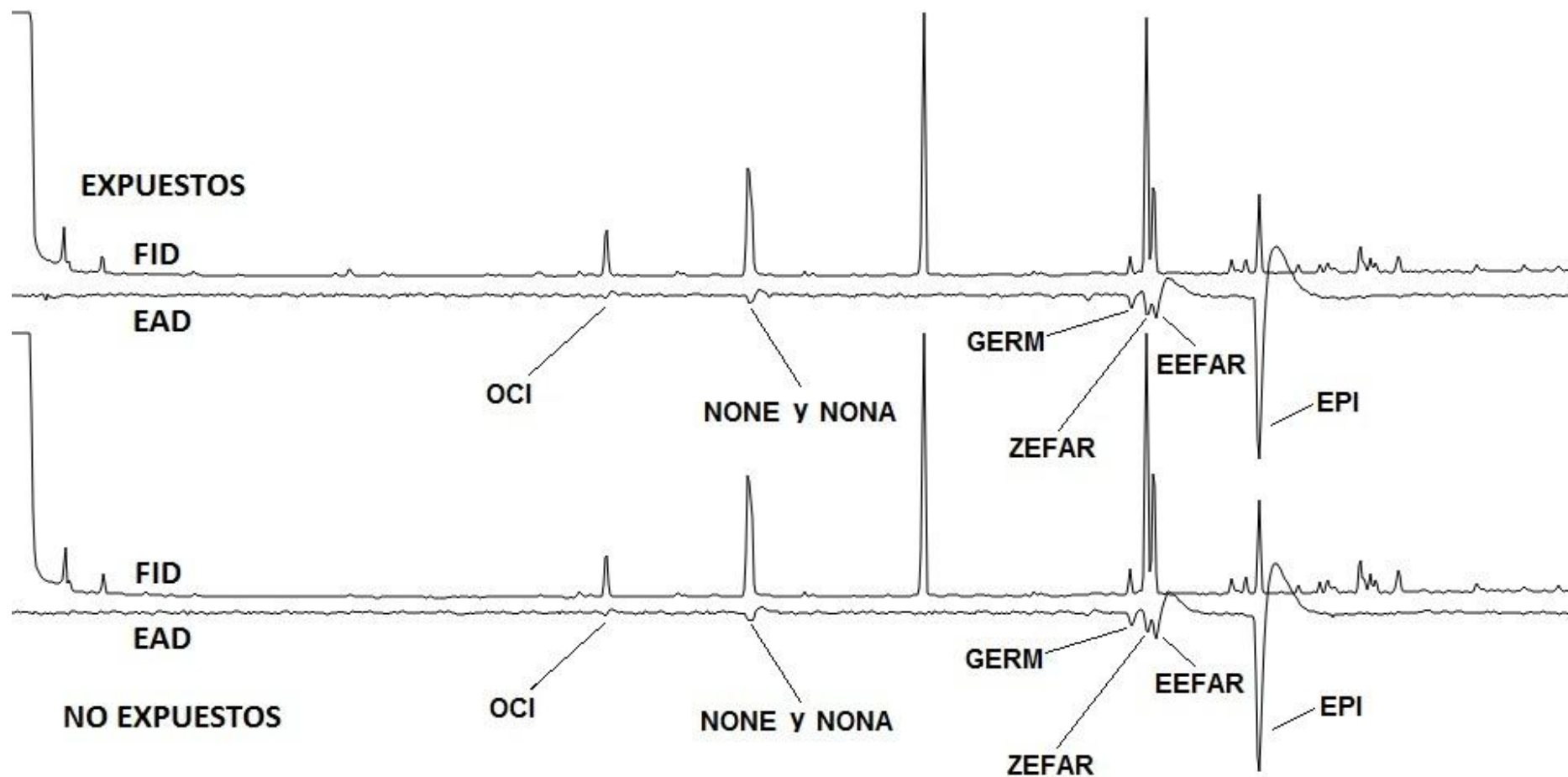


Figura 3.6: Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección para la respuesta electroantenográfica de hembras ante extractos volátiles de machos expuestos o no expuestos a guayaba. Para volátiles de ambos tipos de machos (expuestos y no expuestos) se muestra un cromatograma (FID), con picos hacia arriba, asociado al electroantenograma (EAD), con picos hacia abajo. Los compuestos que presentan actividad electroantenográfica muestran picos de EAD y FID con los mismos tiempos de retención. El nombre completo de los compuestos se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.4. Comparación de la respuesta relativa media de antenas de hembras ante compuestos volátiles colectados de machos expuestos y no expuestos a guayaba, utilizando un cromatógrafo gaseoso acoplado a un electroantenodetector (GC-EAD).

COMPUESTO	RESPUESTA RELATIVA MEDIA ± EE		t ₄	p
	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS		
OCI	24,32 ± 11,34	38,12 ± 11,67	1,183	0,302
NONE	117,69 ± 26,65	119,98 ± 27,20	0,073	0,945
NONA	88,042 ± 28,78	124,08 ± 29,77	1,078	0,342
GERM	77,00 ± 37,95	93,16 ± 37,49	1,512	0,205
ZEFAR	179,92 ± 61,07	158,22 ± 63,09	2,470	0,069
EEFAR	155,55 ± 43,77	183,93 ± 74,16	0,590	0,587
EPI	1408,05 ± 262,26	1187,32 ± 323,74	1,642	0,176

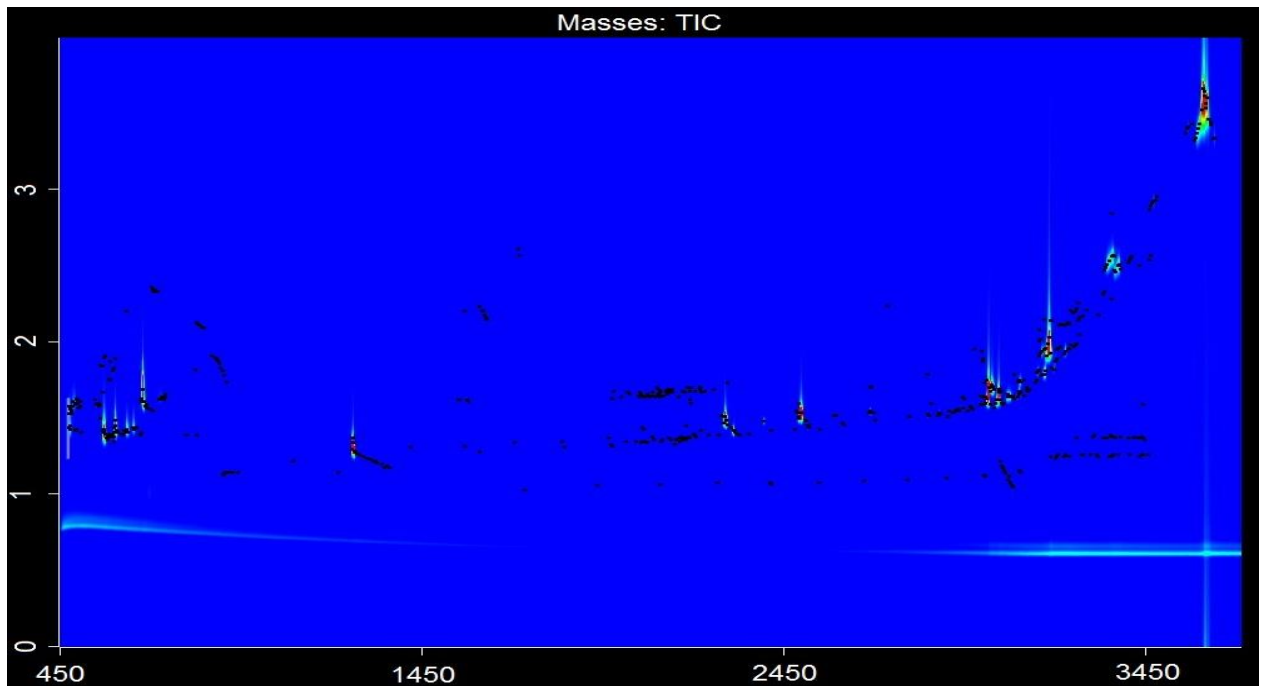
Se muestra la respuesta relativa media de 5 repeticiones (5 antenas distintas) y los valores t y p correspondientes a pruebas t de Student para muestras dependientes. El nombre completo de los compuestos se muestra en la Tabla 1. Referencias. t₄: valor estadístico con grados de libertad igual a 4.

3.3.2. Comparación de compuestos de cutícula de los machos

3.3.2.1 Análisis por CGxGC/TOF-MS de los lavados cuticulares: comparación visual

La Figura 3.7 muestra, a modo de ejemplo, dos cromatogramas correspondientes a los lavados cuticulares de machos expuestos y machos no expuestos a guayaba. Al comparar visualmente cuadro por cuadro los cromatogramas de las 8 réplicas de los compuestos extraídos de la cutícula de los machos expuestos a guayaba con los de los machos no expuestos no se encontraron diferencias apreciables (Figura 3.7).

a)



b)

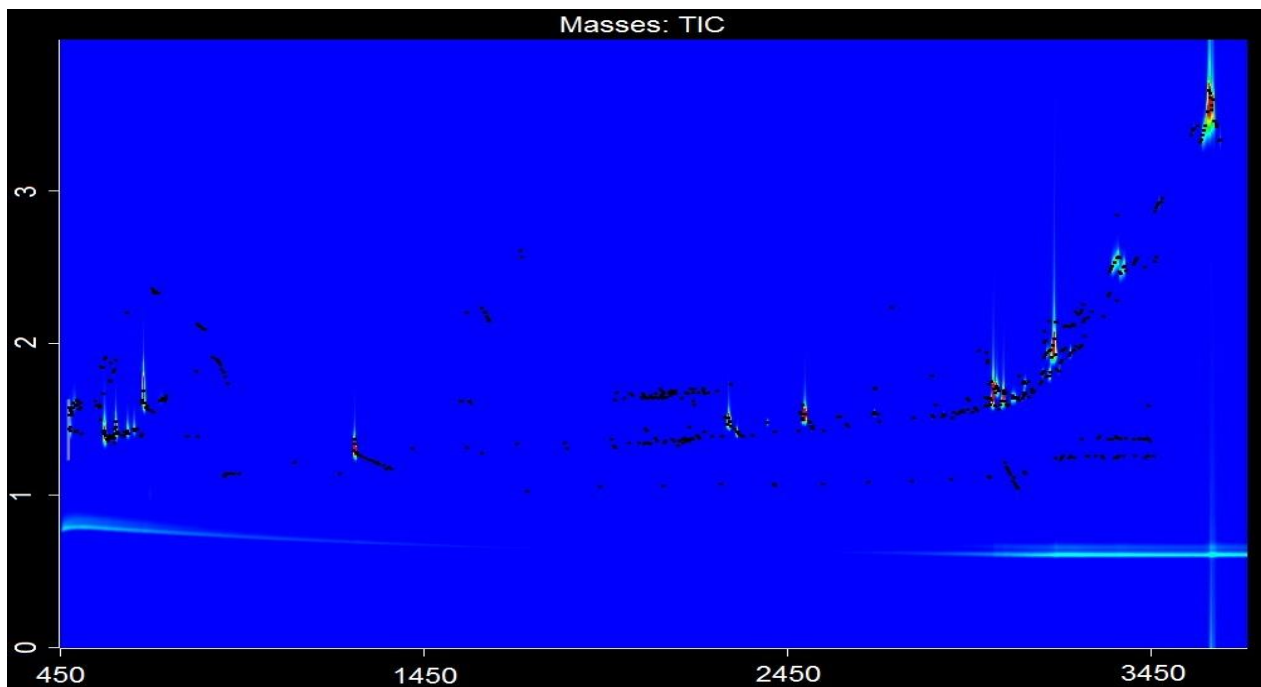


Figura 3.7. Ejemplos de cromatogramas correspondientes a los compuestos extraídos de la cutícula de los machos, obtenidos mediante el análisis por CGxGC/TOF-MS. **a)** machos expuestos a guayaba. **b)** machos no expuestos. Se observa la CTI (Corriente Total de Iones) detectada. En cada cromatograma, el eje horizontal y vertical representa el tiempo de retención correspondiente a la primera y segunda columna cromatográfica (primera y segunda dimensión), respectivamente. Ambos tiempos se encuentran expresados en segundos. Cada punto observable en los cromatogramas corresponde a un pico cromatográfico detectado por el programa. El número de réplicas fue 8 para ambos tipos de macho.

3.3.2.2. Análisis por CGxGC/TOF-MS de los lavados cuticulares: comparación cualitativa y cuantitativa de los compuestos estudiados

Los compuestos α -pineno, β -mirceno, p-cimeno, nonanal, α -E-bergamoteno, geranylacetona y germacreno D no se encontraron en los lavados de ningún tipo de macho. Los compuestos 2-etil hexanol, Z-3-nonenol, (E-Z)-3,6-nonadienol y anastrefina se encontraron presentes solamente en lavados de machos no expuestos en escasas réplicas (1, 2, 1 y 3, respectivamente) y en muy bajas concentraciones (trazas). Las abundancias relativas de los compuestos presentes en ambos tipos de macho no arrojaron diferencias significativas entre machos expuestos y no expuesto cuando se analizaron mediante pruebas t de Student para muestras dependientes (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Comparación cuantitativa de los compuestos seleccionados en machos expuestos y no expuestos a guayaba para los lavados cuticulares.

COMPUESTO	CANTIDAD RELATIVA MEDIA \pm EE		t ₇	p
	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS		
HEXE	$(20,54 \pm 1,71) \times 10^3$	$(20,38 \pm 1,34) \times 10^3$	0,067	0,947
PIN	nd.	nd.	-	-
MYR	nd.	nd.	-	-
CYM	nd.	nd.	-	-
HEXA	nd.	tr.	-	-
LIM	$(2,74 \pm 0,57) \times 10^1$	$(12,83 \pm 10,51) \times 10^1$	0,992	0,353
OCI	$(6,88 \pm 2,50) \times 10^2$	$(5,74 \pm 1,43) \times 10^2$	0,438	0,674
NONANAL	nd.	nd.	-	-
NONE	nd.	tr.	-	-
NONA	nd.	tr.	-	-
BER	nd.	nd.	-	-
GERA	nd.	nd.	-	-
GERM	nd.	nd.	-	-
SUS	$(16,33 \pm 11,46) \times 10^1$	$(6,40 \pm 1,14) \times 10^1$	0,908	0,393
ZEFAR	$(2,48 \pm 1,42) \times 10^2$	$(4,25 \pm 1,62) \times 10^2$	0,652	0,534
EEFAR	$(11,88 \pm 2,72) \times 10^3$	$(17,69 \pm 2,63) \times 10^3$	1,204	0,267
ANA	nd.	tr.	-	-
EPI	$(15,57 \pm 3,72) \times 10^2$	$(31,75 \pm 12,61) \times 10^2$	1,269	0,244

Se muestra la cantidad relativa media de cada compuesto y los valores t y p correspondientes a pruebas t de Student para muestras dependientes. El número de réplicas fue 8 para cada tipo de macho. El nombre completo de los compuestos se muestra en la Tabla 3.1. Referencias. t₇: valor estadístico con grados de libertad igual a 7; nd: no detectado; tr: trazas.

3.3.2.3. Análisis multivariado de los compuestos estudiados

El análisis de componentes principales de los compuestos seleccionados correspondiente a los lavados cuticulares mostró que no existen claras agrupaciones definidas en el espacio bidimensional. Los factores que más explicaron la varianza sumaron un 71,34% del total de la misma. Los correspondientes autovalores fueron 3,63 y 2,79 para los factores 1 y 2, respectivamente (Figura 3.8).

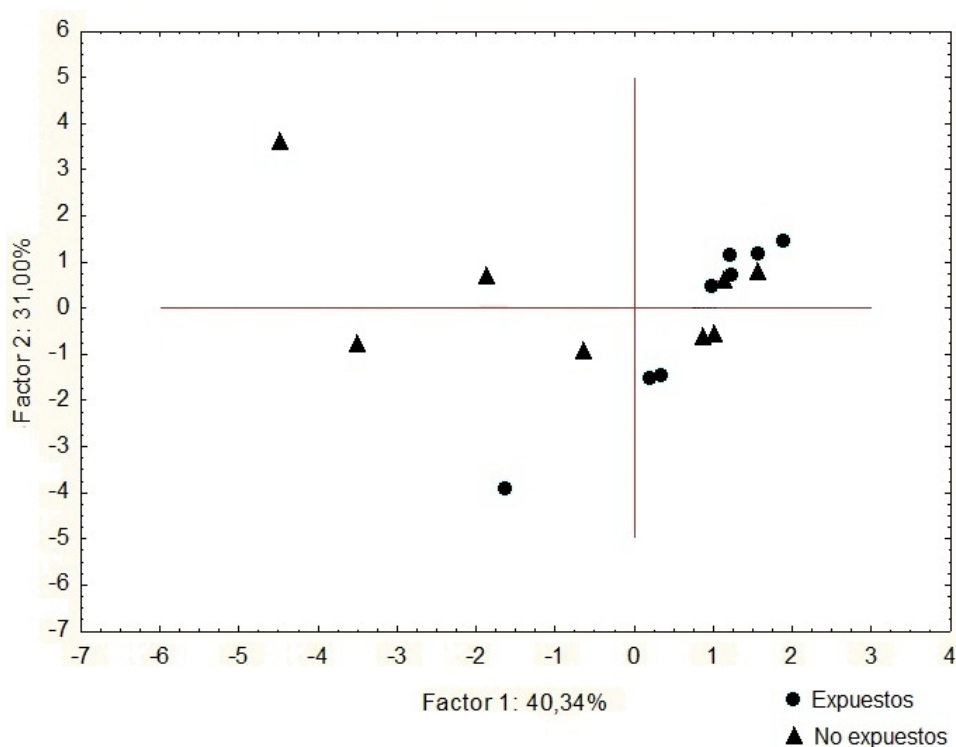


Figura 3.8. Análisis de Componentes Principales para volátiles de machos expuestos y no expuestos a guayaba. Se muestran los 2 factores que más explicaron la varianza entre las muestras. El número de réplicas fue 8 para machos expuestos y no expuestos.

3.3.2.4. Electroantenografía de compuestos de cutícula de los machos

Las respuestas electroantenográficas de las hembras fueron similares cuando se las estimuló con el extracto de compuestos de cutícula de ambos tipos de macho ($t_7=1,061$; $p=0,324$) (Figura 3.9).

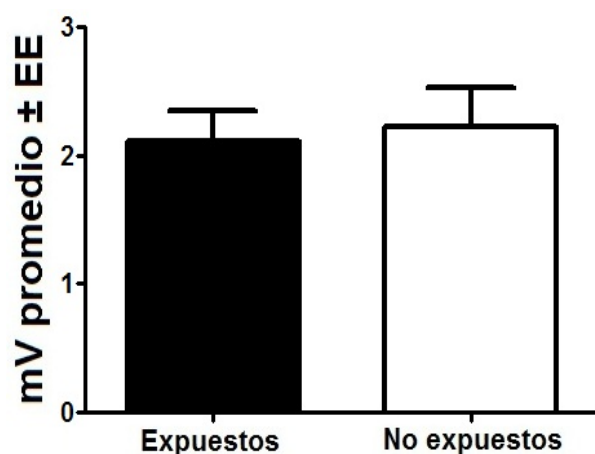


Figura 3.9. *Respuesta electroantenográfica de hembras ante la mezcla de compuestos extraídos de la cutícula de los machos expuestos a guayaba o no expuestos. Los valores se expresan en mili Voltios y son el promedio de 10 repeticiones para cada una de las 8 réplicas. Estas 8 réplicas fueron a su vez promediadas para construir el gráfico. Las barras representan el error estándar de la media. Referencias. mV: mili Voltios; EE: error estándar.*

3.3.2.5. Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenodetección para compuestos de cutícula de los machos

Las antenas de las hembras presentaron 12 respuestas consistentes (en 2 o más antenas) durante los análisis de CG-EAD en los cuales se utilizaron compuestos extraídos de machos expuestos y no expuestos a guayaba (Figura 3.10). Cinco de los compuestos responsables de las respuestas electroantenográficas fueron identificados como: E-2-hexenol*, E-β-ocimeno*, nonanal*, Z-3-nonenol y epianastrefina. La identidad de los compuestos seguidos de un asterisco se encuentra basada en cálculos de índices de Kovats, ya que no se dispuso de estándares para estos compuestos. Los 7 compuestos restantes no pudieron ser identificados. Las pruebas t de Student no arrojaron diferencias significativas entre machos expuestos a guayaba y machos no expuestos para la respuesta relativa media de cada uno de los 12 compuestos (Tabla 3.6).

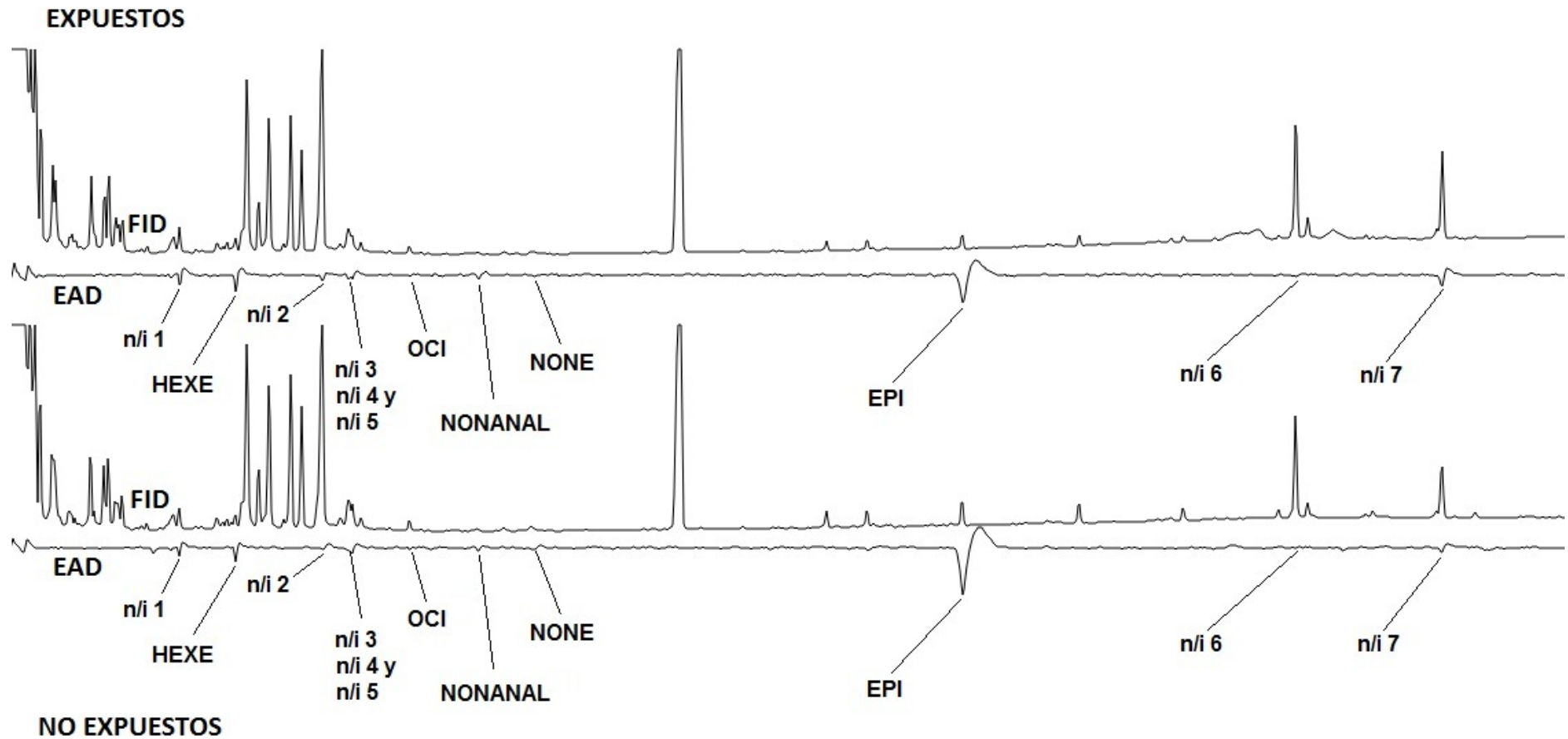


Figura 3.10. Cromatografía gaseosa acoplada a electroantenedetección para la respuesta electroantegráfica de hembras ante compuestos extraídos de la cutícula de machos expuestos o no expuestos a guayaba. Para compuestos extraídos de la cutícula de ambos tipos de machos (expuestos y no expuestos) se muestra un cromatograma (FID), con picos hacia arriba, asociado al electroantegrograma (EAD), con picos hacia abajo. Los compuestos que presentan actividad electroantegráfica presentan picos de EAD y FID con los mismos tiempos de retención. El nombre completo de los compuestos se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.6. Comparación de la respuesta relativa media de antenas de hembras ante compuestos extraídos de la cutícula de machos expuestos o no expuestos a guayaba, utilizando un cromatógrafo gaseoso acoplado a un electroantenodetector (GC-EAD).

COMPUESTO	RESPUESTA RELATIVA MEDIA ± EE		t ₃	p
	EXPUESTOS	NO EXPUESTOS		
HEXE	71,92 ± 11,78	78,23 ± 10,89	0,327	0,765
OCI	15,80 ± 10,77	22,05 ± 2,69	0,887	0,440
NONANAL	13,15 ± 9,68	51,72 ± 39,69	1,354	0,269
NONE	4,21 ± 4,87	16,38 ± 12,70	1,654	0,197
EPI	82,17 ± 30,64	139,78 ± 39,28	1,113	0,347
n/i 1	63,94 ± 14,04	58,20 ± 9,88	0,288	0,792
n/i 2	20,99 ± 8,92	45,32 ± 25,58	1,252	0,299
n/i 3	30,83 ± 16,49	6,18 ± 7,14	1,549	0,219
n/i 4	12,68 ± 8,73	33,12 ± 15,08	1,403	0,255
n/i 5	26,83 ± 4,80	25,71 ± 9,08	0,163	0,881
n/i 6	8,56 ± 6,16	3,60 ± 4,16	0,869	0,449
n/i 7	24,21 ± 12,98	15,81 ± 10,86	0,435	0,693

Se muestra la respuesta relativa media de 4 repeticiones (4 antenas distintas) y los valores t y p correspondientes a pruebas t de Student para muestras dependientes. El nombre completo de los compuestos se muestra en la Tabla 3.1. Referencias. t₃: valor estadístico con grados de libertad igual a 3.

3.4. Discusión

La búsqueda de compuestos volátiles y de cutícula que poseen los machos y que son atribuibles a la exposición a fuentes de compuestos volátiles es un área muy poco explorada en moscas tefrítidas, y los trabajos relacionados son escasos y fueron realizados en otros géneros. A su vez, existen estudios realizados en machos de *A. fraterculus* de distintas poblaciones cuyo objetivo fue caracterizar química y electrofisiológicamente la feromona y los compuestos de cutícula. No obstante, estos trabajos varían considerablemente en la metodología utilizada y en la diversidad de los compuestos hallados. Esto limita la posibilidad de discutir los resultados encontrados en el presente capítulo con estudios previos. Sin embargo, los resultados presentados aquí generan información novedosa que ciertamente servirá de base para estudios futuros.

La comparación de los volátiles de machos expuestos y no expuestos a guayaba mediante GCxGC/TOF-MS indicó que no existen mayores diferencias en la composición química entre ambos tipos de macho. En primera instancia, no se encontraron diferencias apreciables entre los cromatogramas mediante la comparación visual y, a su vez la comparación de cada uno de los 18 compuestos analizados no arrojó diferencias significativas para ninguno de ellos. El estudio por EAG mostró que las antenas de las hembras responden por igual a los eluidos de los compuestos volátiles de ambos tipos de macho. Asimismo, en el estudio por GC-EAD de estos volátiles se observó que las antenas de las hembras responden con similar intensidad a 7 de los compuestos presentes en la mezcla. En cuanto a los lavados cuticulares, los análisis comparativos mediante GCxGC/TOF-MS tampoco indicaron mayores diferencias entre machos expuestos y no expuestos. No hubo diferencias significativas en las respuestas electroantenográficas de las hembras y, en el estudio por GC-EAD las antenas detectaron 12 compuestos, aunque sin diferencias de intensidad entre los lavados cuticulares de ambos tipos de macho.

Los compuestos de guayaba (E-2-hexenol, α -pineno, β -mirceno, p-cymeno, limoneno y E- β -ocimeno) no se hallaron significativamente en mayor cantidad en volátiles de machos expuestos a este fruto. Asimismo, en el análisis multivariado no se observaron grupos definidos que diferencien a ambos tipos de macho. Estos compuestos fueron incluidos porque de acuerdo a la evidencia previa (Hughes 1974, Byers 1982, Landolt y Phillips 1997) los mismos podrían haber sido incorporados por los machos (a través de su cutícula) luego de la exposición al fruto de guayaba. Sin embargo, todos ellos fueron detectados tanto en machos expuestos como en machos no expuestos. Esto indica que el mayor éxito de apareamiento observado en los machos expuestos a guayaba no se debe a un perfil químico con diferencias cualitativas en la feromona, sino que se podría deber a diferencias un tanto sutiles de abundancia relativa de algunos compuestos. Cabe destacar que para estos cinco compuestos (salvo E-2-hexenol) el promedio de su abundancia es numéricamente superior en machos expuestos. Este resultado podría indicar que los individuos efectivamente adquirieron estos volátiles y que las diferencias no significativas podrían deberse a los elevados errores estándar obtenidos. En un futuro estudio debería considerarse incrementar el número de réplicas para disminuir estos errores.

Por su parte, en los lavados cuticulares solamente se encontraron 3 de los compuestos de guayaba (E-2-hexenol, limoneno y E- β -ocimeno) y ninguno de ellos presentó cantidades con diferencias significativas entre machos expuestos y no expuestos. Aunque sin significancia, el limoneno se encontró en mayor cantidad en machos no expuestos. No obstante, es un

compuesto que también está presente en los machos de *A. fraterculus* (Lima *et al.* 2001, Cáceres *et al.* 2009, Břízová *et al.* 2013, Milet-Pinheiro *et al.* 2015), sin que estos sean expuestos a ningún componente vegetal. Los únicos antecedentes de lavados cuticulares en *A. fraterculus* son los de Vaníčková *et al.* (2012, 2015) para el cual se analizaron solamente los hidrocarburos cuticulares (aquí no considerados) y bajo un contexto de reconocimiento de diferentes poblaciones, sexos y edades, muy diferentes al del presente estudio y por ende no resulta posible realizar comparaciones ya que no existen compuestos en común con aquellos trabajos. Para *C. capitata*, Mavraganis *et al.* (2008) compararon los lavados cuticulares entre machos silvestres y de laboratorio y encontraron, entre otros compuestos, que el α -copeno y el nonanal se encontraban únicamente presentes en los machos silvestres, probablemente obtenidos de plantas a las cuales los machos de laboratorio no tienen acceso. Sin embargo, en el presente estudio ninguno de estos compuestos fue hallado en los lavados cuticulares. Aunque aquí, en los compuestos volátiles se encontró nonanal algo más concentrado en los machos expuestos, es poco probable que este compuesto provenga de la exposición a guayaba, ya que Břízová *et al.* (2013) lo hallaron en machos de distintas poblaciones de laboratorio de *A. fraterculus* y Cáceres *et al.* (2009) hicieron lo propio en una población de laboratorio de Argentina, lo cual podría indicar que, a diferencia de *C. capitata*, en *A. fraterculus* el compuesto sería producido por los individuos independientemente de la exposición a fuentes vegetales. En conclusión, así como se vio para los análisis de volátiles, los compuestos de cutícula no parecen estar afectados por la exposición a guayaba, y entonces la preferencia de las hembras por machos expuestos no estaría mediada por un reconocimiento de diferencias cualitativas en este tipo de señal entre machos expuestos y no expuestos.

El estudio de EAG fue realizado para evaluar si en la mezcla de todos los compuestos volátiles o de cutícula existían compuestos atribuidos a la exposición a guayaba (y por lo tanto solo presentes en machos expuestos) que contribuyeran a una respuesta electroantegráfica significativamente mayor en hembras. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre machos expuestos y no expuestos. Esto podría deberse a que las mezclas ensayadas no eran sustancialmente diferentes o que la presencia en común de un compuesto para el cual la respuesta electroantegráfica fuera muy fuerte ocultara la existencia de diferencias menores debida a compuestos diferenciales. Por ende se continuó el estudio mediante la técnica de GC-EAD. En la mayoría de los antecedentes en los que se realizaron estudios de GC-EAD la respuesta electroantegráfica de cada compuesto fue relativizada al área de su correspondiente pico cromatográfico, por lo que la intensidad de respuesta de la antena es un estimador de lo relevante que es el compuesto para esa especie. En el presente estudio las

respuestas electroantenográficas fueron relativizadas al pico cromatográfico del estándar interno, lo que permitió comparar la respuesta de cada compuesto entre ambos tipos de macho. Siete compuestos de las muestras de volátiles y 12 de las muestras de lavados cuticulares presentaron respuestas electroantenográficas en las hembras, resultando cada uno de ellos en diferencias no significativas entre machos expuestos y no expuestos para la respuesta electroantenográfica de las antenas de hembras co-específicas. Esto apoya la idea de que la preferencia de las hembras por machos expuestos no se debe a la presencia de compuestos específicos en estos individuos, sino que podría deberse a diferencias cuantitativas en compuestos que todos los machos poseen. Por otro lado, cabe destacar que para el caso de los volátiles, los compuestos Z-3-nonenol, (E-Z)-3,6-nonadienol, (Z,E)- α -farneseno, (E,E)- α -farneseno y epianastrefina fueron previamente informados como electroantenográficamente activos en hembras de *A. fraterculus* (Břizová *et al.* 2010, 2011, 2013, Milet-Pinheiro *et al.* 2015), pero que el presente estudio resulta ser el primer registro de los compuestos E- β -ocimeno y germacreno D (de las muestra de volátiles) y a E-2-hexenol, E- β -ocimeno, nonanal y otros 7 compuestos que aún quedan por identificar (de las muestras de lavados cuticulares) como compuestos antenalmente activos para hembras de *A. fraterculus*.

Papadopoulos *et al.* (2006) indicaron que en *C. capitata* existe una relación directa entre la actividad de llamado sexual y la frecuencia de apareamiento que logran los machos. Por razones logísticas, en este capítulo no se registró la actividad de llamado sexual de los machos, pero en el Capítulo 2, se demostró que los machos expuestos a guayaba realizaron más frecuentemente las actividades asociadas al comportamiento de llamado sexual ("fanning" y expansión de glándulas salivales). Este resultado del Capítulo 2, más la falta de evidencia en apoyo al "efecto perfume" de este capítulo sugieren que el mecanismo del mejoramiento de los machos de *A. fraterculus* expuestos a guayaba estaría más bien relacionado con un cambio fisiológico interno en los individuos que causa el incremento en la tasa de llamado sexual y la liberación de feromonas. Esto sucede en varias especies de *Bactrocera*, aunque en este género el mejoramiento de machos se logra mediante la ingesta de compuestos que se incorporan a la mezcla de feromonas sexuales (o precursores de las mismas) y los vuelven más atractivos para las hembras (Shelly y Villalobos 1995, Shelly 2000, Wee *et al.* 2007, Kumaran y Clarke 2014). Aunque resulta poco probable que los machos de *A. fraterculus* presenten el mismo mecanismo que en *Bactrocera* debido a que los individuos no pudieron ingerir vía oral los compuestos de las guayabas (ya que no tuvieron acceso físico a las mismas), aún existe un mecanismo posible relacionado con la incorporación de compuestos volátiles de plantas a través de la cutícula (Hughes 1974, Byers 1982, Yasui *et al.* 2007, 2008).

No obstante, aun cuando esto ocurra, los resultados obtenidos por GCxGC-MS mostraron que la feromona no cambia cualitativamente, sino que este cambio sería (como se vio en el Capítulo 2) más bien cuantitativo.

La falta de diferencias entre volátiles y lavados cuticulares de machos expuestos y no expuestos en los análisis comparativos mediante GCxGC/TOF-MS puede deberse a algunos motivos, no excluyentes entre sí. En primer lugar, es probable que los compuestos que quedan adheridos en el cuerpo de los machos tras la exposición a guayaba se encuentren en muy bajas cantidades, en el límite de la detectabilidad o que la mezcla presente tal complejidad que no sea de fácil separación mediante una columna cromatográfica. No obstante, el hecho de usar un equipo cromatográfico de dos dimensiones, mediante el cual los compuestos pueden ser separados por columnas cromatográficas de distintas polaridades, permite evitar en buena medida la co-elución de compuestos (Kalinová *et al.* 2006). En segundo lugar, el tiempo transcurrido entre la exposición a guayaba y la recolección de volátiles y lavados cuticulares de los machos (11 días) puede haber sido excesivo, de manera que los compuestos pudieron haberse disipado de sus cuerpos antes de la toma de las muestras. En los trabajos relacionados con la exposición a compuestos o fuentes que incrementan el éxito de apareamiento de los machos de *C. capitata*, la exposición suele realizarse entre 12 y 72 horas previas a los ensayos comportamentales (Shelly 2001, Shelly *et al.* 2004b, Papadopoulos *et al.* 2006, Kouloussis *et al.* 2013, entre otros). Aún cuando el largo período de tiempo transcurrido desde el fin de la exposición hasta las tomas de muestras podría explicar la falta de diferencias químicas entre machos expuestos y no expuestos, la prueba de apareamiento realizada tan solo 1 día antes de la obtención de las muestras de volátiles y lavados cuticulares demuestra que las hembras fueron capaces de discriminar entre ambos tipos de macho ya que se aparearon preferencialmente con los machos expuestos. Esto indica que, o bien existen diferencias químicas que no pudieron ser detectadas mediante cromatografía gaseosa (pero que las hembras sí las detectaron) o bien no existen tales diferencias químicas y el mejoramiento de los machos se debe a un mecanismo diferente al del “efecto perfume” planteado por Shelly *et al.* (2007a) para *C. capitata*.

Los resultados de este capítulo sugieren que la exposición a volátiles de guayaba no parece alterar considerablemente el perfil químico de los machos de manera que pueda ser considerada la hipótesis del “efecto perfume” (Shelly *et al.* 2007a) como mediador del mecanismo del incremento del éxito de apareamiento de los machos. No obstante, el complejo comportamiento de apareamiento que presentan las especies de esta familia de insectos, el cual involucra la evaluación de los machos por parte de las hembras mediante

señales de corto alcance (Nation 1989, Landolt y Phillips 1997, Briceño *et al.* 2007), sugiere la existencia de señales químicas detectadas por las hembras. Estas diferencias químicas entre machos expuestos y no expuestos podrían estar presentes en muy pequeñas cantidades de manera que no fueron detectados en el presente estudio, pero serían suficientes para que las hembras los detecten. Estos resultados representan el primer paso hacia la búsqueda de los compuestos que resultan biológicamente relevantes para las hembras en un contexto de selección sexual. Por ejemplo, las respuestas electroantenográficas permiten averiguar si la antena presenta receptores neuronales ante los estímulos químicos, pero no muestra qué tipo de respuesta comportamental (de atracción/repulsión durante la orientación hacia el lek o durante la selección de pareja) provocan en los individuos. Estudios a futuro deberían considerar bioensayos en los que se evalúe la capacidad de atracción de las hembras ante estos compuestos que pueden cumplir diferentes roles en el comportamiento de apareamiento de *A. fraterculus*.

3.5. Referencias

- Briceño D, Eberhard WG y Shelly TE. 2007. Male courtship behavior in *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) that have received aromatherapy with ginger root oil. *Florida Entomologist*. 90:175–179.
- Břízová R, Vaníčková L, Kalinová B, Do Nascimento RR y Hoskovec M. 2010. Sex specific differences in preception of the pheromone in *Anastrepha fraterculus*. Proc. 26th ISCE Annual Meeting, Tours, France, pp. 210.
- Břízová R. 2011. Analyses of male sex pheromone of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). MSc thesis. Institute of Chemical Technology Prague, Czech Republic.
- Břízová R, Mendonça AL, Vaníčková L, Mendonça AL, Da Silva CE, Tomčala A, et al. 2013. Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Florida Entomologist*. 96: 1107–1115.
- Byers JA. 1982. Male-specific conversion of the host plant compound, myrcene, to the pheromone, (+)-ipsdienol, in the bark beetle, *Dendroctonus brevicomis*. *Journal of Chemical Ecology*. 8: 363–371.
- Cáceres C, Segura DF, Vera MT, Wornoapayorn V, Cladera JL, Teal P, et al. 2009. Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of the Linnean Society*. 97: 152–165.
- Dyck VA, Hendrichs J y Robinson AS. 2005. Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Flath RA, Cunningham RT, Mon TR y John JO. 1994a. Additional male Mediterranean fruitfly (*Ceratitidis capitata* Wied.) attractants from angelica seed oil (*Angelica archangelica* L.). *Journal of chemical ecology*. 20(8): 1969-1984.
- Flath RA, Cunningham RT, Mon TR y John JO. 1994b. Male lures for Mediterranean fruitfly (*Ceratitidis capitata* Wied.): structural analogs of α -copaene. *Journal of chemical ecology*. 20(10): 2595-2609.
- Flores S, Rivera JP, Hernandez E y Montoya P. 2011. The Effect of Ginger Oil on the Sexual Performance of *Anastrepha* Males (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 94(4): 916-922.
- Hughes PR. 1974. Myrcene: a precursor of pheromones in Ips beetles. *Journal of Insect Physiology*. 1271-1275.
- Idstein H y Schreier P. 1985. Volatile constituents from guava (*Psidium guajava*, L.) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33(1): 138-143.
- Jaldo HE, Gramajo C y Willink E. 2001. Mass rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): a preliminary strategy. *Florida Entomologist*. 84: 716–718.

- Ji QE, Chen JH, McInnis DO y Guo QL. 2013. The effect of methyl eugenol exposure on subsequent mating performance of sterile males of *Bactrocera dorsalis*. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 238-243.
- Kalinová B, Jiros P, Zd'árek J, Wen X y Hoskovec M. 2006. GC× GC/TOF MS technique—A new tool in identification of insect pheromones: Analysis of the persimmon bark borer sex pheromone gland. *Talanta*. 69(3): 542-547.
- Kalinová B. 2011. Analysis of epicuticular composition in genera *Anastrepha* and *Ceratitis*. Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Overcome Constraints to SIT Application and International Trade. Report of research contract 16106. Instituto de química Orgánica y Bioquímica, Praga, República Checa.
- Katsoyannos BI, Kouloussis NA y Papadopoulos NT. 1997. Response of *Ceratitis capitata* to citrus chemicals under semi-natural conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 82(2): 181-188.
- Kouloussis NA, Katsoyannos BI, Papadopoulos NT, Ioannou CS y Iliadis IV. 2013. Enhanced mating competitiveness of *Ceratitis capitata* males following exposure to citrus compounds. *Journal of Applied Entomology*. 137 (1): 30–38.
- Kumaran N, Balagawi S, Schutze MK y Clarke AR. 2013. Evolution of lure response in tephritid fruit flies: phytochemicals as drivers of sexual selection. *Animal Behaviour*. 85: 781–789.
- Kumaran N y Clarke AR. 2014. Indirect effects of phytochemicals on offspring performance of Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 138(5): 361-367.
- Landolt PJ y Phillip TW. 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*. 42: 371–91. PMID: 15012318
- Lima IS, House PE y Nascimento RRD. 2001. Volatile substances from male *Anastrepha fraterculus* Wied.(Diptera: Tephritidae): identification and behavioural activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 12(2): 196-201.
- Mahattanatawee K, Goodner KL y Baldwin EA. 2005. Volatile constituents and character impact compounds of selected florida's tropical fruit. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 118: 414–418.
- Malo EA, Cruz-López L, Toledo J, Del Mazo A, Virgen A y Rojas JC. 2005. Behavioral and electrophysiological responses of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) to guava volatiles. *Florida Entomologist*. 88(4): 364-371.
- Mavraganis VG, Liaropoulos C, Papadopoulos NT, Kouloussis NA y Broumas T. 2008. Whole body extract of Mediterranean fruit fly males elicits high attraction in virgin females. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 127(1): 20-29.
- McLafferty FW, Stauffer DB, Stenhagen E y Heller SR. 1989. En: *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 1st edition*. Eds. McLafferty FW, Stauffer DB. Wiley, New York, USA.
- Milet-Pinheiro P, Navarro DM, De Aquino NC, Ferreira LL, Tavares RF, da Silva RDC, et al. 2015. Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Chemoecology*. 25(3): 115-122.
- Morató S, Shelly T, Rull J y Aluja M. 2015. Sexual competitiveness of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) males exposed to Citrus aurantium and Citrus paradisi essential oils. *Journal of Economic Entomology*. tou054.
- Morelli R, Paranhos BJ, Coelho AM, Castro R, Garziera L, Lopes F y Bento JMS. 2013. Exposure of sterile Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) males to ginger root oil reduces female remating. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 75-82.
- Nation JL. 1989. The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies. En: *World crop pests: fruit flies, their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam. pp. 189–205.
- Papadopoulos NT, Shelly TE, Niyazi N y Jang E. 2006. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior*. 19: 403–418.
- Papadopoulos NT, Kouloussis NA y Katsoyanos BI. 2008. En: *Proceedings of the 7th International Symposium on fruit Flies of Economic Importance*. Ed. Sugayama RL, Zucchi RA, Ovruski SM y Sivinski J. Press Color Graficos Especializados, Brotas, Bahia, Brazil.

- Pereira R, Yuval B, Liedo P, Teal PEA, Shelly TE, McInnis DO y Hendrichs J.** 2011. Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *Journal of Applied Entomology*. doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01664.x.
- Pino JA, Ortega A y Rosado A.** 1999. Volatile constituents of guava fruits from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 11(5) 623–629.
- Pino JA, Marbot R y Vázquez C.** 2001. Characterization of volatiles in strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(12): 5883-5887.
- Pino JA, Marbot R y Vázquez C.** 2002. Characterization of volatiles in Costa Rican guava [*Psidium friedrichsthalianum* (Berg) Niedenzu] fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(21): 6023-6026.
- Robacker DC y Hart WG.** 1986. Behavioral response of male and female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to male-produced chemicals in laboratory experiments. *Journal of chemical ecology*. 12: 39–47.
- Shelly TE y Villalobos EM.** 1995. Cue lure and the mating behavior of male melon flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 473-482.
- Shelly TE.** 2000. Effects of raspberry ketone on the mating success of male melon flies (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*. 34: 143-147.
- Shelly TE.** 2001. Exposure to alpha-copaene and alpha-copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 94: 497–502.
- Shelly TE y McInnis DO.** 2001. Exposure to ginger root oil enhances mating success of irradiated, mass-reared males of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic Entomology*. 94(6): 1413-1418.
- Shelly TE, Rendon P, Hernandez E, Salgado S, McInnis D, Villalobos E y Liedo P.** 2003. Effects of diet, ginger root oil, and elevation on the mating competitiveness of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from a mass-reared, genetic sexing strain in Guatemala. *Journal of economic Entomology*. 96(4): 1132-1141.
- Shelly TE y Villalobos E.** 2004. Host plant influence on the mating success of male Mediterranean fruit flies: variable effects within and between individual plants. *Animal Behaviour*. 68: 417–426.
- Shelly T, Dang C y Kennelly S.** 2004a. Exposure to orange (*Citrus sinensis* L.) trees, fruit, and oil enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata* [Wiedemann]). *Journal of insect behavior*. 17(3): 303-315.
- Shelly TE, McInnis DO, Pahio E y Edu J.** 2004b. Aromatherapy in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): sterile males exposed to ginger root oil in prerelease storage boxes display increased mating competitiveness in field-cage trials. *Journal of economic Entomology*. 97(3): 846-853.
- Shelly TE, Edu J, Pahio E y Nishimoto J.** 2007a. Scented males and choosy females: does male odor influence female mate choice in the Mediterranean fruit fly? *Journal of Chemical Ecology*. 33: 2308–2324. PMID:1803053
- Shelly T, Edu J, Smith E, Hoffman K, War M, Santos R, et al.** 2007b. Aromatherapy on a large scale: exposing entire adult holding rooms to ginger root oil increases the mating competitiveness of sterile males of the Mediterranean fruit fly in field cage trials. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 123(2): 193-201.
- Shelly TE.** 2008. Aromatherapy and Medfly SIT. En: *Proceedings of the 7th International Symposium on fruit Flies of Economic Importance*. Eds. Sugayama RL, Zucchi RA, Ovruski SM y Sivinski J. Press Color Graficos Especializados, Brotas, Bahia, Brazil.
- Shelly TE, War M y Favela A.** 2008. Exposing entire adult holding rooms containing sterile male Mediterranean fruit flies to orange oil increases the mating success of those males in field-cage trials. *Florida entomologist*. 91(4): 686-689.
- Soares FD, Pereira T, Marques MOM y Monteiro AR.** 2007. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food chemistry*. 100(1): 15-21.
- Teal PEA, Gómez-Simuta Y y Proveaux AT.** 2000. Mating experience and juvenile hormone enhance sexual signalling and mating in male Caribbean fruit flies. *PNAS*. 97: 3708–3712. PMID: 10706642
- Vaničková L, Svatoš A, Kroiss J, Kaltenpoth M, Do Nascimento RR, Hoskovec M, et al.** 2012. Cuticular hydrocarbons of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus*: variability with sex and age. *Journal of chemical ecology*. 38(9): 1133-1142.

- Vaníčková L, Břízová R, Mendonça AL, Pompeiano A y Do Nascimento RR.** 2015. Intraspecific variation of cuticular hydrocarbon profiles in the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) species complex. *Journal of Applied Entomology*. 139(9): 679-689.
- Vera MT, Abraham S, Oviedo A y Willink E.** 2007. Demographic and quality control parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) artificial rearing. *Florida Entomologist*. 90: 53-57.
- Vera MT, Ruiz MJ, Oviedo A, Abraham S, Mendoza M, Segura DF, et al.** 2013. Fruit compounds affect male sexual competitiveness in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 2-10.
- Wee SL y Tan KH.** 2007. Temporal accumulation of phenylpropanoids in male fruit flies, *Bactrocera dorsalis* and *B. carambolae* (Diptera: Tephritidae) following methyl eugenol consumption. *Chemoecology*. 17(2): 81-85.
- Yasui H, Yasuda T, Fukaya M, Akino T, Wakamura S, Hirai Y, et al.** 2007. Host plant chemicals serve intraspecific communication in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied entomology and zoology*. 42(2): 255-268.
- Yasui H, Akino T, Fukaya M, Wakamura S y Ono H.** 2008. Sesquiterpene hydrocarbons: kairomones with a releaser effect in the sexual communication of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). *Chemoecology*. 18(4): 233-242.

Capítulo 4

Efecto del tratamiento con metopreno sobre el desempeño sexual en machos de *Anastrepha fraterculus*

4.1. Introducción

La hormona juvenil (HJ) de los insectos pertenece a la familia de los sesquiterpenoides no cíclicos, compuestos químicos que actúan sobre el sistema endócrino y regulan numerosos aspectos de la fisiología de los insectos tales como el desarrollo, la metamorfosis, la diapausa, la reproducción y el polifenismo (Vogel *et al.* 1979, Nijhout 1994, Riddiford 1994, Wyatt *et al.* 1996). Existen varios tipos de HJ, pero la mayoría de los insectos contienen solamente la denominada HJ III ($C_{16}H_{26}O_3$) (Figura 4.1a), siendo probablemente la variedad HJ III bisepóxido ($C_{16}H_{26}O_4$) (Figura 4.1b) la más importante en el orden Diptera (Richard *et al.* 1989) y específicamente en moscas de la familia Tephritidae (Teal *et al.* 2000).

El efecto de la HJ depende del estado de desarrollo de los individuos. En términos generales, en los estados larvales promueve el desarrollo y crecimiento mientras que previene la metamorfosis. En el estado adulto, la función más relevante que ejerce es el cambio fisiológico asociado a la reproducción. En la mayoría de los insectos, el período pre-copulatorio ocurre bajo control hormonal en el cual la HJ ejerce un rol clave y regula el comportamiento reproductivo en ambos sexos (Happ 1992; Wyatt y Davey 1996; Gilbert *et al.* 2000; Wilson *et al.* 2003). En las hembras, la HJ tiene una función importante en el control de la producción de huevos, estimulando la vitelogénesis y el almacenamiento de lípidos en las ovarias y disminuyendo la reabsorción de ovocitos (Gruntenko *et al.* 2005). Además, la receptividad sexual está estrechamente coordinada con el desarrollo de ovarias que a su vez se encuentra regulada por hormonas (Ringo 2002). En los machos, la HJ estimula el desarrollo y maduración de las glándulas reproductivas accesorias, promoviendo el crecimiento y la producción de secreciones glandulares (Yin *et al.* 1999, Wilson *et al.* 2003, Klowden 2007) y la producción de feromona sexual (Rantala *et al.* 2003b).

Debido a que la HJ es fotosensible y difícil de sintetizar, se han desarrollado compuestos funcionalmente análogos a la misma, como el metopreno ($C_{19}H_{34}O_3$) (Figura 4.1c). Este compuesto es conocido debido a su capacidad larvicida en insectos plaga, sobre todo en el control de mosquitos responsables de la propagación de enfermedades como el dengue y la malaria (WorldHealthOrganization2008). También es ampliamente utilizado en diversas áreas de investigación en reemplazo de la HJ natural. Bajo el marco de la Técnica del Insecto Estéril aplicada en moscas tefritidas, se ha explorado el uso del metopreno para disminuir el tiempo necesario para alcanzar la madurez sexual del macho, reduciendo así los costos de mantenimiento de los individuos antes de ser liberados (Teal *et al.* 2011, Segura *et al.* 2013). En este sentido, Teal *et al.* (2000) mostraron que el tratamiento de machos de *A. suspensa* con

HJ o con su análogo, metopreno, durante las primeras horas post-emergencia aceleró la maduración sexual. El tiempo de maduración promedio se redujo de 7 días (cuando los machos no fueron tratados) a 4 días (cuando fueron tratados). Este período de tiempo para el cual solamente han madurado los machos tratados es denominado “fase de madurez sexual acelerada” (FMSA) (Figura 4.2). La aceleración de la madurez sexual fue descrita posteriormente en otras especies de tefrítidos, como en *A. ludens* (Gómez-Simuta *et al.* 2011), *A. obliqua* (Chacón-Benavente *et al.* 2013) y *Bactrocera cucurbitae* Coquillett (Haq *et al.* 2010a, 2011). En otras especies, como *C. capitata*, el metopreno no aceleró la madurez sexual (Faria *et al.* 2008, Shelly *et al.* 2009). En *A. fraterculus*, el efecto del metopreno sobre la maduración de los machos fue estudiado por Segura *et al.* (2009, 2013) y Liendo *et al.* (2013). Como otras especies del mismo género, en estos estudios se demostró que el tratamiento con metopreno redujo el tiempo de maduración de los machos a 4 días en promedio (Segura *et al.* 2013).

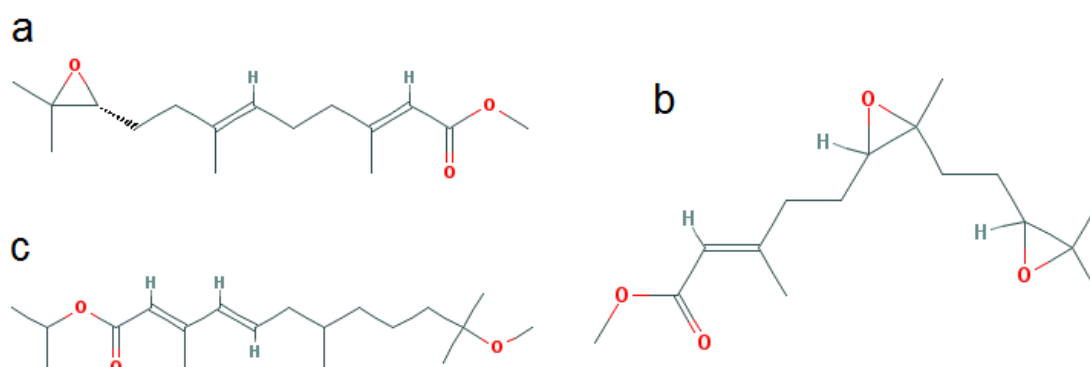


Figura 4.1. Estructuras de: a) hormona juvenil III; b) hormona juvenil III bisepóxido; c) metopreno.

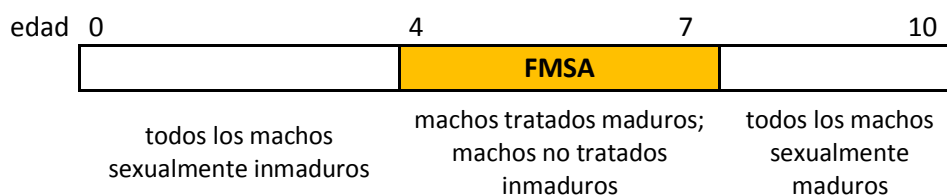


Figura 4.2. FMSA. Representación del estado de madurez sexual más probable según la edad (en días post-emergencia del adulto) y el tratamiento con metopreno para machos de laboratorio de las especies estudiadas del género *Anastrepha* (*A. fraterculus*, *A. suspensa*, *A. ludens* y *A. obliqua*).

En machos de algunas especies, la aceleración de la maduración sexual atribuida al metopreno induce una mayor competitividad sexual y, consecuentemente, un mayor éxito de apareamiento durante la FMSA. De esta manera, los machos tratados que se encuentran en la FMSA logran un éxito de apareamiento semejante al de los machos no tratados que ya superaron esta fase (>7 días post-emergencia) y que alcanzaron la madurez sexual naturalmente (sin tratamiento con metopreno). Esto se observó para *A. ludens* (Gómez-Simuta y Teal 2010, Gómez-Simuta *et al.* 2011), *A. suspensa* (Pereira *et al.* 2009, 2011b) y *A. fraterculus* (Segura *et al.* 2009, Liendo *et al.* 2013). Por su parte, Teal *et al.* (2000) y Teal y Gómez-Simuta (2002) postularon que el mayor éxito en el apareamiento observado durante la FMSA de los machos de *A. suspensa* que fueron tratados con metopreno puede deberse a un incremento en la producción de feromona sexual. En consistencia con esta hipótesis, Chacón-Benavente *et al.* (2013) describieron que los machos de *A. obliqua* tratados con metopreno liberaron mayor cantidad de feromona sexual durante la FMSA que los machos no tratados de igual edad. Esto tiene sentido si se tiene en cuenta, como se mencionó anteriormente, que la producción de feromona se encuentra regulada por la HJ (Rantala *et al.* 2003b) y que los machos tratados con metopreno pueden tener altas concentraciones de HJ en la hemolinfa (Haq *et al.* 2010). En *A. fraterculus* se conoce poco acerca de los mecanismos (especialmente los relacionados al comportamiento de llamado y a la emisión de feromona sexual) asociados al fenómeno de competitividad sexual y mejoramiento del éxito de apareamiento observado en machos tratados con metopreno.

Los estudios previos muestran que, como fue mencionado anteriormente, el metopreno acelera la maduración sexual de los machos de muchas especies y que, en algunos casos, puede provocar que machos que se encuentran en la FMSA logren el mismo éxito de apareamiento que los machos de mayor edad que maduraron naturalmente, sin tratamiento. Sin embargo, en tefritidos y en particular en los géneros *Anastrepha* y *Bactrocera*, se ha puesto poca atención en el estudio acerca del efecto que produce el metopreno cuando se ha superado la FMSA (>9 días post-emergencia). Para estas edades todos los machos ya alcanzaron su madurez sexual, incluso si no fueron tratados con metopreno. En *A. suspensa*, Pereira *et al.* (2010) encontraron que el metopreno parece inducir un incremento en el éxito de apareamiento en los machos tratados aún en etapas posteriores a la FMSA. Comprobaron que machos sexualmente maduros y tratados con metopreno fueron más competitivos, obteniendo mayor número de cópulas que machos no tratados de las mismas edades. Estos resultados sugieren un doble rol del metopreno, como inductor de la madurez sexual y también como un potenciador del éxito de apareamiento de los machos ya maduros. Por otro

lado, Haq *et al.* (2010) no encontraron un efecto potenciador del metopreno a edades posteriores a la FMSA para *B. cucurbitae*. Por lo tanto el fenómeno de potenciación de los machos podría depender de la especie estudiada, aunque el bajo número de ejemplos no permite un análisis general sobre la efectividad del metopreno como potenciador.

Es sabido que durante la cópula los machos de muchas especies de insectos transfieren a las hembras compuestos bioactivos como HJ (Park *et al.* 1998, Clifton *et al.* 2014), ecdisteroides (Pondeville *et al.* 2008), proteínas (Dottorini *et al.* 2007, Sirot *et al.* 2008, 2011), entre otros, comúnmente llamados “productos de glándulas accesorias” (PGAs). Estos compuestos derivan de las glándulas reproductivas accesorias de los machos e inducen respuestas fisiológicas en las hembras (Guillott 2003). Por ejemplo, en la polilla *Heliothis virescens* (Ochsenheimer) (Lepidoptera: Noctuidae) Park *et al.* (1998) y Shu *et al.* (1998) mostraron que las glándulas accesorias de los machos contenían HJ y otros componentes que inducen la síntesis endógena de HJ en las hembras, estimulando la producción de huevos. Más tarde, Pszczolkowski *et al.* (2006) demostraron que la concentración de HJ en las glándulas de los machos de esta especie está positivamente asociada con la capacidad reproductiva de la hembra con la que se apareó, sugiriendo que los machos pueden influenciar la fecundidad de las hembras a través de la transferencia de HJ en los PGAs. En *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae), Fernández y Klowden (1995) encontraron que los machos tratados con metopreno acumularon mayor cantidad de PGAs que los machos no tratados del mismo estado nutricional. Dado que en muchas especies la HJ (o análogos como el metopreno) beneficia a las hembras incrementando la maduración de sus gónadas y la producción de huevos, podría postularse que las hembras prefieren a machos tratados con metopreno probablemente debido a la posibilidad de estos machos de transferir HJ durante la cópula. Se podría postular que este fenómeno sería beneficioso principalmente para hembras que están cercanas a iniciar el proceso reproductivo, ya que las hembras de edades más avanzadas (y por lo tanto, presumiblemente más desarrolladas), deberían contener mayores niveles de HJ.

Actualmente no existen trabajos que estudien los mecanismos próximos detrás del aumento del éxito copulatorio de los machos tratados con metopreno. Este efecto podría deberse a que el metopreno es asimilado por los individuos desencadenando una serie de procesos que derivan en cambios fisiológicos que los hacen más atractivos para las hembras. O bien, el mecanismo podría ser atribuido a un efecto de perfumado que resulta atractivo para las hembras, como lo observado en *C. capitata* por Shelly *et al.* (2007) y Papadopoulos *et al.* (2006) con aceites esenciales de jengibre y de cítricos, respectivamente y como fue estudiado en el Capítulo 3 de esta tesis con el fruto de la guayaba.

En este capítulo se investiga el efecto del tratamiento con metopreno sobre la competitividad sexual de los machos de *A. fraterculus* en etapas posteriores a la FMSA (>9 días), para las que todos los machos han alcanzado la madurez sexual independientemente del tratamiento con metopreno. Además se investiga sobre la duración que tiene este efecto. Se postula que estos machos tratados pueden ser más competitivos (y así lograr más cópulas, potenciando su éxito de apareamiento) que los machos maduros de la misma edad que no fueron tratados. En otras palabras, el metopreno podría provocar que un macho logre niveles de competitividad aún mayores que el que puede alcanzar un macho que madura naturalmente. A su vez, se investiga cómo la edad de las hembras puede influir sobre la preferencia de aparearse con machos tratados con metopreno. Finalmente, se estudiaron posibles mecanismos que subyacen al fenómeno de potenciación del éxito copulatorio en machos, evaluando el comportamiento de llamado y la emisión de feromona sexual.

4.1.1. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del tratamiento de topicado con metopreno sobre el éxito de apareamiento de los machos y dilucidar los mecanismos subyacentes de este fenómeno.

Objetivos específicos

- 1- Estudiar el efecto del tratamiento con metopreno sobre el éxito de apareamiento en machos maduros de 10-12 días de edad.
- 2- Evaluar si el efecto del metopreno sobre el éxito de apareamiento se evidencia en machos de 18-22 días de edad.
- 3- Determinar si el efecto potenciador del metopreno se debe a un efecto de perfumado [*sensu* Shelly *et al.* (2007)].
- 4- Evaluar la preferencia por machos tratados con metopreno en hembras de diferentes edades.
- 5- Estudiar los mecanismos asociados al fenómeno de potenciación del éxito de apareamiento en machos tratados con metopreno, evaluando el comportamiento de llamado sexual y la emisión de feromona.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Material biológico

Para los experimentos realizados como parte de este capítulo se utilizaron insectos de laboratorio obtenidos del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF), INTA Castelar. Los métodos de cría se encuentran detallados en la sección “Material Biológico” del Capítulo 2. Todas las moscas utilizadas en los ensayos se encontraban sexualmente maduras: 10-12 días post-emergencia para machos y hembras jóvenes; 18-22 días post-emergencia para machos y hembras de avanzada edad (Jaldo 2001, Jaldo *et al.* 2007, Petit-Marty *et al.* 2007, Segura *et al.* 2013).

4.2.2. Éxito de apareamiento de machos

Se realizaron tres experimentos consistentes en pruebas de preferencia para el apareamiento (experimentos 1, 2 y 3) (Tabla 4.1.). Para ello, primero se trató a los machos con metopreno mediante la aplicación (topicado) de 1 μ l de una solución de metopreno en acetona con una concentración de 5 μ g/ μ l sobre el tórax de cada macho (Teal *et al.* 2000). Esto se realiza con la ayuda de una micro pipeta automática (Eppendorf Multipette® plus; Beckman Instruments, INC.; Fullerton, California, EE.UU.). Luego se realizaron las “Pruebas de apareamiento” consistentes en arenas experimentales, cada una conteniendo un macho tratado, un macho control y una hembra. Los detalles de estas pruebas se describen en el Capítulo 2. En todos los experimentos se utilizaron como control a machos (de la misma edad que los machos tratados) que no recibieron el tratamiento con metopreno. Las variables para estimar la preferencia de las hembras fueron: elección de macho, latencia para la cópula y duración de la cópula, tal como fue realizado en el Capítulo 2. Para evaluar si la elección por el tipo de macho (tratado o no tratado) es dependiente de la edad de las hembras, en las arenas experimentales se liberaron hembras jóvenes (10 a 12 días) o hembras de edad avanzada (18 a 22 días).

4.2.3. Experimento 1. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 10-12 días post-emergencia

En este primer experimento se evaluó si el tratamiento con metopreno incrementa el éxito de apareamiento de los machos de *A. fraterculus*. El tratamiento fue realizado dentro de las

primeras 24 hs post-emergencia de los machos y se esperó a que estos alcanzaran los 10-12 días de edad (etapa posterior a la FMSA) para realizar la prueba de apareamiento. Se realizaron 82 réplicas (arenas experimentales) con hembras jóvenes (10-12 días) y 95 con hembras de edad avanzada (18-22 días). Este experimento se corresponde con los objetivos 1 y 4.

4.2.4. Experimento 2. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 18-22 días post-emergencia

Con el fin de determinar si el efecto del metopreno sobre la competitividad de los machos se verifica a intervalos de tiempo mayores que los evaluados en el Experimento 1, el tratamiento fue también realizado durante las primeras 24 hs post-emergencia de los machos pero, en este caso, se esperó 18-22 días hasta la realización de la prueba de apareamiento. Se realizaron 103 réplicas con hembras jóvenes (10-12 días) y 104 con hembras de edad avanzada (18-22 días). Este experimento se corresponde con los objetivos 2 y 4.

4.2.5. Experimento 3. Efecto de perfumado del metopreno

Con el objetivo de determinar si el tratamiento con metopreno es capaz de inducir un aumento de la competitividad sexual de los machos debido un efecto de perfumado, se repitió la prueba de apareamiento pero con machos tratados a los 8 días post-emergencia. La edad de los machos durante la prueba de apareamiento fue de 10-12 días. El tratamiento con metopreno fue, por lo tanto, realizado poco tiempo antes de la prueba de apareamiento, de manera de que si existiese el efecto de perfumado, este sea detectado por las hembras. Se realizaron 86 réplicas con hembras jóvenes (10-12 días) y 87 con hembras de edad avanzada (18-22 días). Este experimento se corresponde con los objetivos 3 y 4.

Tabla 4.1. Resumen de las características de los individuos involucrados en las pruebas de apareamiento de los diferentes experimentos.

	Edad del macho el día del tratamiento con metopreno	Edad de los machos el día de la prueba de apareamiento
Experimento 1	0 días (sexualmente inmaduro)	10-12 días (jóvenes)
Experimento 2	0 días (sexualmente inmaduro)	18-22 días (edad avanzada)
Experimento 3	8 días (sexualmente maduro)	10-12 días (jóvenes)

Cada uno de los tres experimentos involucró pruebas de apareamiento con hembras jóvenes (10 a 12 días) y hembras de avanzada edad (18 a 22 días).

4.2.6. Experimento 4. Comportamiento de llamado sexual y emisión de feromonas por parte de los machos

Para comprender los mecanismos que subyacen el fenómeno del mejoramiento del éxito en el apareamiento de machos mediante el tratamiento con metopreno, se realizaron observaciones del comportamiento de llamado sexual (comportamientos de “fanning” y de “exposición de glándulas salivales”) y colectas de feromona (analizando los compuestos suspensolide, farneseno, anastrefina y epianastrefina) de machos tratados y no tratados según se detalla en el Capítulo 2. Ambas actividades se realizaron en simultáneo, utilizando la cámara de colecta de volátiles para realizar las observaciones comportamentales. Para estos experimentos se utilizaron machos de 10-12 días de edad que fueron tratados con metopreno 24 horas post-emergencia (machos de la misma edad y tratamiento que los utilizados en el experimento 1). Tanto para las colectas de feromona como para el registro del comportamiento, el número de réplicas fue 8 para machos tratados y 8 para no tratados. Los compuestos volátiles se analizaron como se describe en el Capítulo 2, en este caso, utilizando tridecano como estándar interno. La cantidad de cada compuesto analizado fue estimada a partir de la integración del correspondiente pico cromatográfico y relativizada al estándar interno. Este experimento se corresponde con el objetivo 5.

4.2.7. Análisis de datos

Para los experimentos 1-3, el número de cópulas logradas por machos tratados y no tratados con metopreno fue comparado mediante una prueba de bondad de ajuste de G, corregida por Yates. Para verificar si existe una tendencia similar en la preferencia en el apareamiento entre

hembras jóvenes y hembras de edad avanzada se comparó la proporción de machos tratados que alcanzaron la cópula para cada tipo de hembra mediante una prueba de homogeneidad de G (Zar 1996). La latencia y duración de las cópulas de estos ensayos se analizaron mediante ANOVAs de 2 vías, en los cuales los factores fueron el tratamiento de los machos y la edad de las hembras. Para el experimento 4, el número de machos realizando los comportamientos de llamado sexual y la cantidad de feromona liberada fueron comparados entre machos tratados y no tratados mediante pruebas t de Student. En todos los casos se comprobaron los supuestos correspondientes a cada prueba estadística (y normalidad para las pruebas de t y normalidad y homocedacia para los ANOVAs).

4.3. Resultados

4.3.1. Experimento 1. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 10-12 días post-emergencia

En la prueba de apareamiento que involucró a hembras jóvenes, los machos tratados con metopreno lograron significativamente mayor cantidad de apareamientos que los no tratados ($G=8,388$; $p<0,01$; $N=82$) (Figura 4.3). En la prueba de apareamiento que involucró a hembras de edad avanzada no hubo diferencias significativas en la cantidad de apareamientos logrados por ambos tipos de macho ($G=1,784$; $p=0,182$; $N=95$) (Figura 4.3), sin embargo la tendencia fue la misma que la observada para hembras jóvenes (Prueba de homogeneidad para la preferencia por machos entre hembras de ambas edades: $G=1,710$, $p=0,191$). La latencia para el apareamiento fue levemente menor en hembras jóvenes que en hembras de edad avanzada, aunque esta diferencia no fue significativa (Tabla 4.2). La duración de la cópula fue mayor para hembras de edad avanzada que para hembras jóvenes, siendo este resultado independiente del tratamiento sobre los machos (Tabla 4.3).

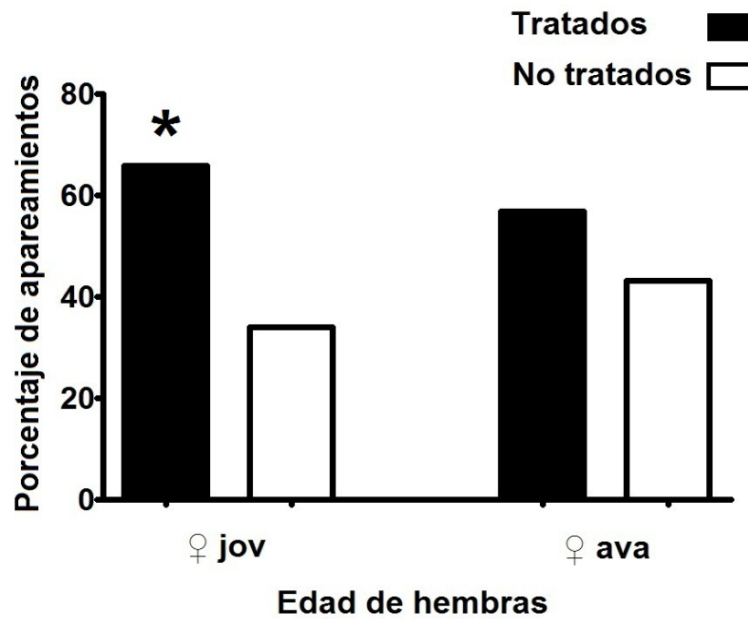


Figura 4.3. Efecto del tratamiento con metopreno sobre el éxito de apareamiento de los machos de 10-12 días post-emergencia (experimento 1). Porcentaje de apareamientos obtenidos por machos tratados y no tratados con metopreno, para hembras jóvenes y de edad avanzada. Los machos fueron tratados el día 1 y evaluados en su éxito de apareamiento el día 10-12 post-emergencia. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre machos tratados y no tratados para la prueba de bondad de ajuste de G. Referencias. ♀jov: hembras jóvenes; ♀ava: hembras de edad avanzada.

Tabla 4.2. Latencia promedio para los apareamientos, correspondiente a los ensayos de preferencia de hembras por machos tratados con metopreno.

Exp.	Hembras	Machos	Latencia ± EE	n	Efecto macho	Efecto Hembra	Interacción
1	Jóvenes	T	13,9 ± 2,5	54	gl=1,175 F=0,283 p=0,595	gl=1,175 F=0,597 p=0,441	gl=1,175 F=0,146 p=0,703
		NT	14,3 ± 3,3	28			
	Edad avanzada	T	14,9 ± 2,0	54			
		NT	17,2 ± 2,2	41			
2	Jóvenes	T	11,2 ± 2,4	58	gl=1,205 F=0,040 p=0,852	gl=1,205 F=11,220 p=0,001	gl=1,205 F=5,780 p<0,001
		NT	16,2 ± 3,0	45			
	Edad avanzada	T	21,7 ± 2,6	63			
		NT	14,5 ± 1,9	41			
3	Jóvenes	T	13,8 ± 1,7	35	gl=1,172 F=1,281 p=0,259	gl=1,172 F=4,243 p=0,041	gl=1,172 F=0,369 p=0,544
		NT	13,4 ± 2,1	51			
	Edad avanzada	T	24,9 ± 3,6	42			
		NT	22,1 ± 3,2	45			

Las últimas tres columnas corresponden a los resultados de ANOVAs de 2 factores. Para los experimentos 2 y 3 se transformaron los valores a " $\ln(x + 0,5)$ " para cumplir el supuesto de homocedacea. **Experimento 1:** machos de 10-12 días, tratados un día post-emergencia vs. machos de 10-12 días, no tratados. **Experimento 2:** machos de 18-22 días, tratados un día post-emergencia vs. machos de 18-22 días, no tratados. **Experimento 3:** machos de 10-12 días, tratados 3 días previo al ensayo vs. machos de 10-12 días, no tratados. La edad de las hembras "jóvenes" es de entre 10 y 12 días. La edad de las hembras de "edad avanzada" es de entre 18 y 22 días. Referencias: Exp: experimento; T: tratados; NT: no tratados.

Tabla 4.3: Duración promedio de las cópulas, correspondiente a los experimentos de preferencia de hembras por machos tratados con metopreno.

Exp.	Hembras	Machos	Duración ± EE	n	Efecto macho	Efecto Hembra	Interacción
1	Jóvenes	T	68,6 ± 4,0	54	gl=1,175 F=0,410 p=0,524	gl=1,175 F=14,240 p<0,001	gl=1,175 F=0,440 p=0,507
		NT	68,7 ± 6,4	28			
	Edad avanzada	T	91,5 ± 5,2	54			
		NT	84,8 ± 4,6	41			
2	Jóvenes	T	71,6 ± 3,2	58	gl=1,205 F=0,120 p=0,725	gl=1,205 F=13,440 p<0,001	gl=1,205 F=1,140 p=0,286
		NT	67,0 ± 3,2	45			
	Edad avanzada	T	83,5 ± 5,2	63			
		NT	82,8 ± 3,8	41			
3	Jóvenes	T	56,3 ± 7,8	35	gl=1,172 F=0,309 p=0,579	gl=1,172 F=9,402 p=0,003	gl=1,172 F=0,518 p=0,473
		NT	53,4 ± 2,6	51			
	Edad avanzada	T	72,0 ± 4,9	42			
		NT	64,7 ± 3,5	45			

Las últimas tres columnas corresponden a los resultados de ANOVAs de 2 factores. Para los experimentos 2 y 3 se transformaron los valores a " $\ln(x + 0,5)$ " para cumplir el supuesto de homocedacea. **Experimento 1:** machos de 10-12 días, tratados un día post-emergencia vs. machos de 10-12 días, no tratados. **Experimento 2:** machos de 18-22 días, tratados un día post-emergencia vs. machos de 18-22 días, no tratados. **Experimento 3:** machos de 10-12 días, tratados 3 días previo al ensayo vs. machos de 10-12 días, no tratados. La edad de las hembras "jóvenes" es de entre 10 y 12 días. La edad de las hembras de "avanzada edad" es de entre 18 y 22 días. Referencias. Exp: experimento; T: tratados; NT: no tratados.

4.3.2. Experimento 2. Efecto del tratamiento con metopreno en machos de 18-22 días post-emergencia

En la prueba de apareamiento que involucró a hembras jóvenes, los machos tratados con metopreno lograron una mayor cantidad de apareamientos que los no tratados pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($G=1,645$; $p=0,200$; $N=103$) (Figura 4.4). En la prueba de apareamiento que involucró a hembras de edad avanzada se observó la misma tendencia a favor de machos tratados (Prueba de homogeneidad para la preferencia por machos entre hembras de ambas edades: $G=0,398$, $p=0,533$), habiendo en este caso diferencias significativas ($G=4,689$; $p=0,030$; $N=104$) (Figura 4.4). Al analizar la latencia para el apareamiento se encontró que las hembras jóvenes se aparean más rápidamente que las hembras de edad avanzada (Tabla 4.2). No se encontraron diferencias en la duración de las cópulas entre hembras de ambas edades (Tabla 4.3).

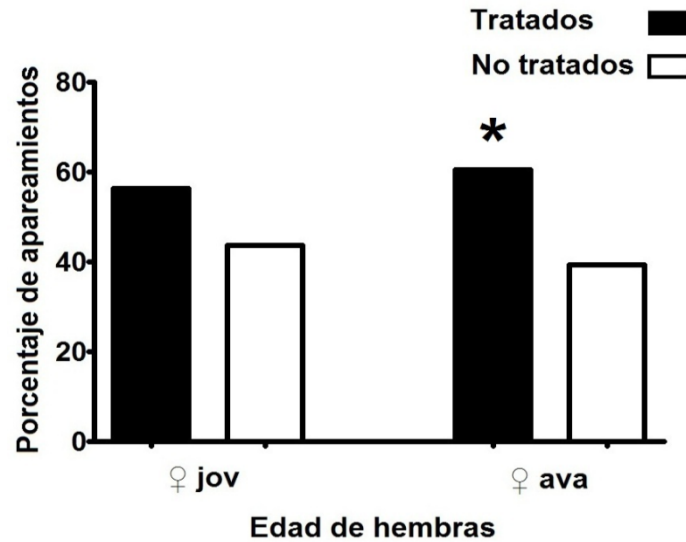


Figura 4.4. Efecto del tratamiento con metopreno sobre el éxito de apareamiento de los machos de 18-22 días post-emergencia (experimento 2). Porcentaje de apareamientos obtenidos por machos tratados y no tratados con metopreno, para hembras jóvenes y de edad avanzada. Los machos fueron tratados el día 1 y evaluados en su éxito de apareamiento el día 18-22 post-emergencia. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre machos tratados y no tratados para la prueba de bondad de ajuste de G. Referencias. ♀jov: hembras jóvenes; ♀ava: hembras de edad avanzada.

4.3.4. Experimento 3. Efecto de perfumado del metopreno

Para hembras de ambas edades, el tratamiento con metopreno no afectó la cantidad de apareamientos, aunque en el caso de hembras jóvenes se registró una tendencia hacia un menor número de apareamientos con machos tratados (hembras jóvenes: $G=2,994$; $p=0,084$; $N=86$; hembras de edad avanzada: $G=0,103$; $p=0,748$; $N=87$) (Figura 4.5). La prueba de homogeneidad para la preferencia por machos entre hembras jóvenes y hembras de edad avanzada no mostró diferencias ($G=1,007$, $p=0,316$). La latencia para el apareamiento fue inferior en hembras jóvenes que en hembras de edad avanzada (Tabla 4.2). La duración de la cópula fue mayor para hembras de edad avanzada que para hembras jóvenes, siendo este resultado independiente del tratamiento sobre los machos (Tabla 4.3).

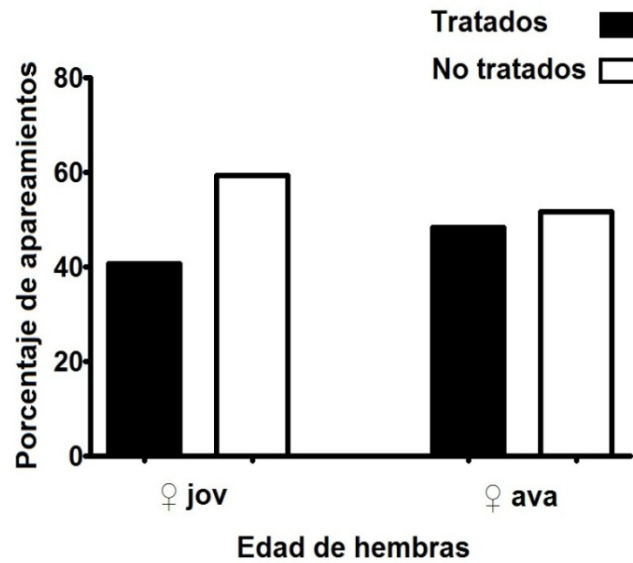


Figura 4.5. Efecto de perfumado del metopreno (experimento 3). Porcentaje de apareamientos obtenidos por machos tratados y no tratados con metopreno, para hembras jóvenes y de edad avanzada. Los machos fueron tratados el día 7-8 y evaluados en su éxito de apareamiento el día 10-12 post-emergencia. Referencias. ♀jov: hembras jóvenes; ♀ava: hembras de edad avanzada.

4.3.5. Experimento 4. Comportamiento de llamado sexual y emisión de feromonas por parte de los machos

El comportamiento de llamado sexual no mostró diferencias significativas entre machos tratados y no tratados para los dos comportamientos registrados (fanning: $t_7=0,769$, $p=0,233$; exposición de glándulas salivales: $t_7=1,672$, $p=0,070$) (Figura 4.6 a,b). La cantidad de feromona liberada fue significativamente mayor para machos expuestos para todos los compuestos estudiados (suspensolide: $t_7=2,606$, $p=0,018$; farneseno: $t_7=2,148$, $p=0,034$; anastrefina: $t_7=2,817$, $p=0,013$; epianastrefina: $t_7=2,440$, $p=0,022$) (Figura 4.6 c-f).

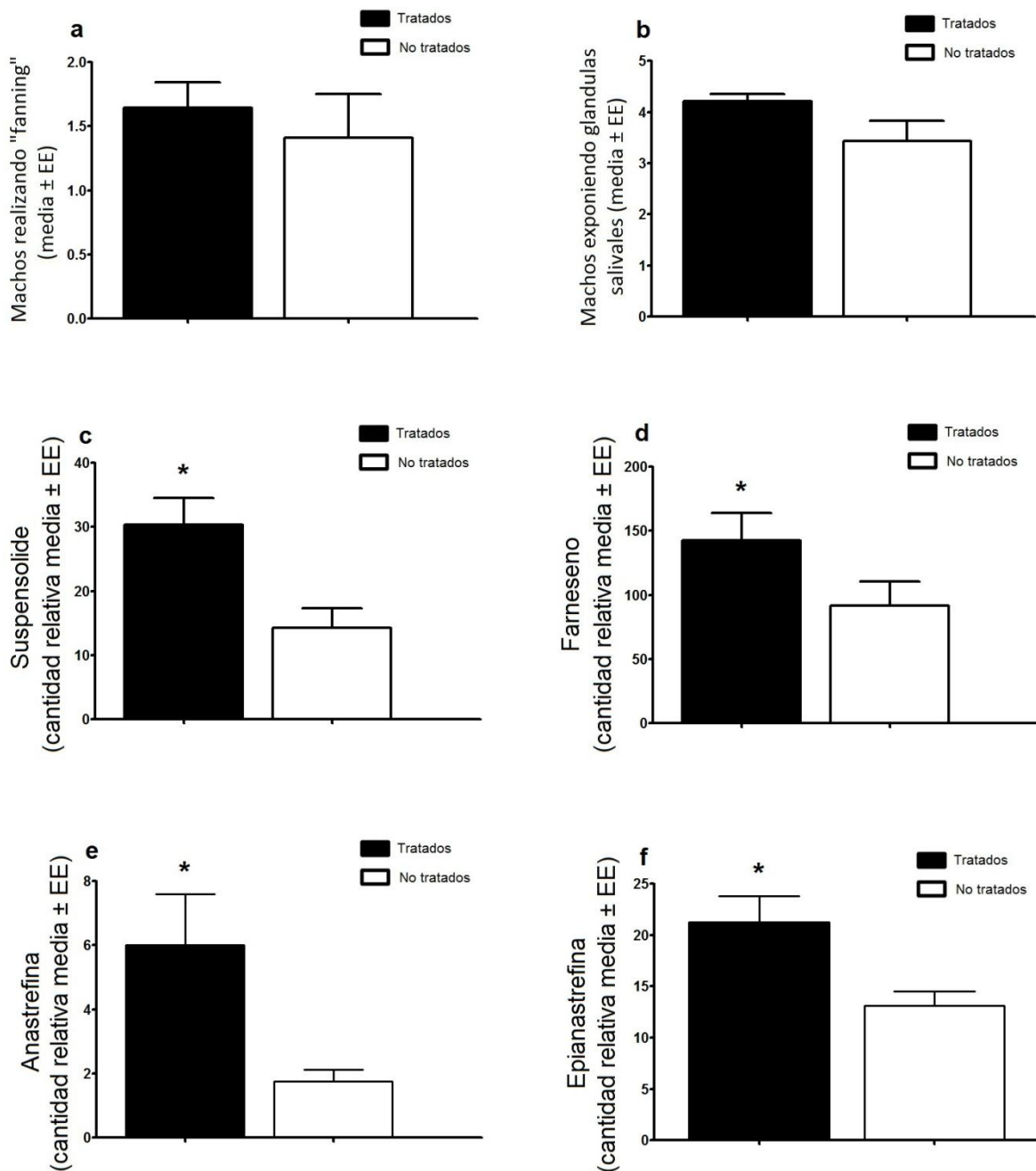


Figura 6. Comportamiento de llamado sexual y cantidad de feromonas liberadas por machos tratados con metopreno. a,b) Número promedio de individuos exhibiendo el comportamiento en cada observación. **c-f)** Promedio de áreas de los picos cromatográficos relativos al estándar interno que representa la cantidad liberada por individuo. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre machos tratados y no tratados para la prueba *t* de Student.

4.4. Discusión

En este estudio se encontró que el tratamiento tópico con metopreno de machos recientemente emergidos resultó en un mejoramiento de su éxito de apareamiento superada la FMSA (experimentos 1 y 2). Las hembras jóvenes mostraron la misma tendencia de preferencia por machos tratados que las hembras de edad avanzada. Si el tratamiento se realiza cuando los machos ya se encuentran sexualmente maduros o muy próximos a la madurez (día 8 post-emergencia, experimento 3) deja de observarse el mejoramiento en el éxito de apareamiento y las hembras de ambas edades no muestran una tendencia marcada por ningún tipo de macho. Los machos tratados con metopreno durante las primeras horas post-emergencia liberaron mayor cantidad de compuestos feromonales que los machos no tratados.

En el experimento 1 se vio que los machos jóvenes (pero sexualmente maduros) y tratados con metopreno dentro de las primeras horas post-emergencia logran mayor cantidad de apareamientos que los machos no tratados de las mismas edades. Este mejoramiento del éxito de apareamiento también ocurre en el experimento 2, con machos de edad avanzada. Los resultados obtenidos en estos dos experimentos concuerdan con los de Pereira *et al.* (2010) utilizando *A. suspensa*. Esto indica que el metopreno incrementa el éxito de apareamiento de los machos en edades superiores a la FMSA y que el efecto no parece disminuir con el paso del tiempo, por lo menos hasta aproximadamente 20 días post-emergencia. En otros estudios, como en Gómez-Simuta *et al.* (2011) con *A. ludens* y en Liendo *et al.* (2013) con *A. fraterculus*, se evaluó la competitividad sexual de machos tratados con metopreno pero lo hicieron a edades muy prematuras (FMSA) para las que la proporción de machos sexualmente maduros es mucho mayor en machos tratados. Bajo el marco de la TIE, es muy relevante saber si los machos a los que se logró reducir su tiempo de maduración y que serán liberados a estas tempranas edades resultan ser tan competitivos como los machos silvestres con los que se encontrarán en el campo. Por el contrario, en este capítulo se centró el interés en lo que ocurre con estos machos que maduraron aceleradamente a edades mayores a 10 días y se encontró que superan significativamente la cantidad de cópulas logradas por los machos maduros no tratados. Esto muestra que el metopreno estaría actuando como un agente potenciador del éxito de apareamiento de los machos, tal como la exposición al fruto de la guayaba (en *A. fraterculus*) o al aceite de raíz de jengibre y a los aceites esenciales de naranja en *C. capitata* (Shelly y McInnis 2001, Papadopoulos *et al.* 2006). Una diferencia con estos trabajos es que en ellos se expuso a los machos a aquellas fuentes, sin acceso directo a los compuestos que estos aceites contienen. Para continuar entendiendo

el fenómeno del aumento del éxito copulatorio por tratamiento con metopreno sería interesante hacer una exposición a metopreno, y no un tratamiento tópico.

Más allá de los efectos madurativos en ambos sexos en tefrítidos, prácticamente no existen estudios que apunten a dilucidar los mecanismos que subyacen al mejoramiento del desempeño sexual de los machos en distintas edades, y lo único que se ha hipotetizado hasta el presente es que se debe a un aumento de la señalización sexual y la producción de feromona (Pereira *et al.* 2010); una hipótesis que no ha sido puesta a prueba en otras especies. En *A. fraterculus*, cuando el tratamiento con metopreno se realizó en momentos en que los machos se encontraban en etapas cercanas a la madurez sexual (experimento 3), el mejoramiento del éxito de apareamiento de los machos tratados deja de observarse. Esto contrasta con el efecto potenciador del metopreno observado cuando este se administra el día de la emergencia, y sugiere que el efecto del metopreno no es inmediato. Con la ausencia del efecto potenciador observado cuando el tratamiento se realizó el día 8 post-emergencia (sólo dos días antes de las pruebas de apareamiento) se puede descartar la posibilidad de un mecanismo de acción basado en un efecto perfume como el que fue observado por Shelly *et al.* (2007) con el aceite de raíz de jengibre, para el cual se propone que las hembras eligen a machos tratados en función de olores de compuestos presentes en la cutícula y que pueden ser directamente atribuibles al compuesto químico aplicado.

Para cada experimento y edad de hembras, las latencias y duraciones de los apareamientos fueron similares entre machos tratados y no tratados. Esto indica que el tratamiento con metopreno realizado sobre los machos no induce en las hembras una más rápida decisión de con que macho aparearse ni provoca apareamientos más prolongados. Cuando Haq *et al.* (2010) evaluaron a los machos a edades superiores a la FMSA, encontraron que la duración de la cópula fue similar entre machos tratados y no tratados, coincidiendo con los resultados aquí encontrados. Por otro lado, cuando se centra la atención en la edad de las hembras, en términos generales se observa que las hembras de edad avanzada tardan más en elegir el macho con el que aparearse (mayor latencia de apareamiento) que las hembras jóvenes. Esto podría ser debido al estado físico algo debilitado de las hembras de edades que rondan los 20 días, por lo menos con respecto a las hembras jóvenes de 10 días. Esto pudo haber provocado que a diferencia de las hembras jóvenes, las hembras de edad avanzada requieran más despliegues sexuales de los machos para verse estimuladas al apareamiento derivando en una mayor latencia. A su vez, las cópulas de las hembras de edad avanzada duraron más que los de las hembras jóvenes. Fritz (2004) observó que existe una correlación positiva entre la duración de la cópula y la cantidad de esperma almacenado por hembras de

A. suspensa. Teniendo en cuenta que la duración de la cópula puede ser un indicador de la cantidad de esperma transferido, la mayor duración de las cópulas de las hembras de edad avanzada podría indicar que estas se abastecieron de mayor cantidad de esperma que las jóvenes. Esto podría explicarse sobre la base de una menor expectativa de vida en las hembras de edad avanzada, las cuales podrían ver reducida la posibilidad de una nueva cópula futura y entonces extender la cópula actual hasta obtener el máximo volumen de esperma posible. Además, es de esperar que la cantidad de huevos desarrollados y listos para su oviposición sea mayor en hembras de edades avanzadas y que por lo tanto estén más necesitadas de esperma.

Se sabe que durante la cópula los machos de muchos dípteros transfieren a las hembras HJ (Clifton *et al.* 2014) que podría estar involucrada en el proceso de maduración sexual de las hembras. Si esto ocurriera en *A. fraterculus*, podríamos esperar una mayor preferencia por machos tratados con metopreno solamente en hembras que se encuentran próximas a completar su desarrollo reproductivo. No obstante, los resultados obtenidos no apoyan esta idea, ya que la preferencia por machos tratados se observó tanto en las hembras jóvenes como en las de edad avanzada. Quizás la preferencia por machos tratados con metopreno esté asociada a un beneficio que exista solamente en hembras jóvenes, pero que la preferencia, a nivel sensorial y/o neuronal, sea un comportamiento fijado en hembras, de manera que aquellas de mayor edad también respondan a favor de machos tratados, independientemente de si el apareamiento con estos machos les resulte ventajoso o no. Debido a que la función principal de la HJ en hembras adultas de muchos insectos es el desarrollo y la maduración de huevos (Guillott 2003; Gruntenko *et al.* 2005), una explicación alternativa para la preferencia de las hembras por machos tratados con metopreno podría estar dada por un beneficio directo en términos de fecundidad. Por lo tanto, alternativamente, se podría proponer que las hembras de ambas edades estarían eligiendo a machos tratados con metopreno debido a que estos serían capaces de transferir mayor cantidad de HJ que les confiera a las hembras una fecundidad más alta. Por último, existen numerosos trabajos que demuestran que durante la cópula se pueden transferir, además de HJ, otros componentes de PGAs que pueden afectar la fisiología reproductiva de la hembra, como ecdisteroides (Pondeville *et al.* 2008) y proteínas (Dottorini *et al.* 2007, Sirot *et al.* 2008, 2011) que son actualmente estudiados en otras especies y que también podrían estar cumpliendo un papel importante en este contexto.

El tratamiento con metopreno el primer día post-emergencia resultó en machos que, 10 días después, liberan mayor cantidad de feromona, en comparación con los machos que no recibieron el tratamiento. Estos resultados se corresponden con el mayor éxito de

apareamiento registrado para los machos tratados, lo que sugiere que las hembras podrían estar eligiendo a los machos en función de la feromona emitida por los mismos. En casi la totalidad de la bibliografía los estudios se centran en la maduración acelerada y las variables registradas corresponden a la FMSA. Sin embargo, coincidiendo con lo encontrado en este capítulo, Chacón-Benavente *et al.* (2013) observaron que los machos de edades superiores a la FMSA que habían sido tratados con metopreno liberaron más feromona que los machos no tratados. Por otro lado, el comportamiento de llamado sexual (variables “fanning” y exposición de glándulas salivales) fue levemente mayor en machos tratados, aunque para ambas variables las diferencias entre ambos tipos de macho no fueron significativas. Esta falta de significancia en las diferencias del llamado sexual entre ambos tipos de macho resulta difícil de comprender, ya que el llamado sexual y la emisión de feromona son comportamientos correlacionados, que en el caso de la exposición a guayaba correlacionan positivamente (ver Capítulo 2). Abraham *et al.* (2013) encontraron que los machos jóvenes tratados con metopreno, aun cuando obtuvieran tantas cópulas como los machos maduros no tratados, no lograban inducir un periodo refractario (tiempo hasta la nueva cópula) en las hembras que fuera comparable a los de los machos que habían madurado naturalmente. Estos autores sugirieron que quizás el tratamiento con metopreno acelere ciertos componentes de sistema sexual, pero no todos, y que se podría producir un desfase entre algunos procesos madurativos. Los resultados obtenidos en este capítulo también muestran un ligero desacople entre el comportamiento de llamado y la emisión de feromona en machos de *A. fraterculus* tratados con metopreno, reforzando la idea de que este análogo de la hormona juvenil podría no actuar de manera igualmente eficaz en todos los procesos madurativos del macho.

A diferencia de la mayoría de los antecedentes relacionados con el estudio del metopreno sobre la competitividad sexual en tefrítidos, aquí se centró el interés en lo que ocurre con los machos una vez que estos superan la FMSA, lo que trascendió en un marcado aumento de la competitividad en machos que fueron tratados en etapas iniciales de su estado adulto. Al igual que lo demostrado con la exposición a volátiles de frutos de guayaba, el tratamiento con metopreno puede ser una herramienta que ayude a mejorar la eficiencia de la TIE a través del aumento de la calidad de los machos estériles que se liberen al campo. Sin embargo, en este estudio solamente se utilizaron machos de laboratorio tratados compitiendo con machos del laboratorio no tratados. Por tanto, para una mayor aproximación a los protocolos establecidos en la TIE, se requiere de nuevos experimentos en los que se involucren a machos silvestres no tratados, así como pruebas de apareamiento en condiciones de semi campo. La persistencia del efecto potenciador observada en machos de madurez sexual

avanzada así como el mantenimiento de la preferencia por machos tratados por parte de hembras longevas resultaría ser aún más beneficioso para la TIE. La preferencia de las hembras por estos machos no parece estar asociada a un beneficio exclusivo de las hembras jóvenes y podría más bien estar asociada a los beneficios que las hembras obtendrían en términos de la producción de huevos, tal como lo encontrado en otras especies de lepidópteros y dípteros (Fernández y Klowden 1995, Pszczolkowski *et al.* 2006). Se requieren nuevos estudios para comprender cuáles son las ventajas que las hembras obtienen por aparearse con machos sexualmente potenciados. Este tema será abordado en el siguiente capítulo.

4.5. Referencias

- Abraham S, Liendo MC, Devescovi F, Peralta PA, Yusef V, Ruiz J, et al.** 2013. Remating behavior in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females is affected by male juvenile hormone analog treatment but not by male sterilization. *Bulletin of Entomological Research*. 103(03): 310-317.
- Chacón-Benavente R, López-Guillen G, Hernández E, Rojas JC y Malo EA.** 2013. Juvenile Hormone Analog Enhances Calling Behavior, Mating Success, and Quantity of Volatiles Released by *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*. 42(2): 262-269.
- Clifton, ME, Correa S, Rivera-Perez C, Nouzova M, y Noriega FG.** 2014. Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 64: 40-47.
- Dottorini T, Nicolaidis L, Ranson H, Rogers DW, Crisanti A y Catteruccia F.** 2007. A genome-wide analysis in *Anopheles gambiae* mosquitoes reveals 46 male accessory gland genes, possible modulators of female behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(41): 16215-16220.
- Faria MJ, Pereira R, Dellinger T y Teal PEA.** 2008. Influence of methoprene and protein on survival, maturation and sexual performance of male *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 132(9-10): 812-819.
- Fernández NM y Klowden MJ.** 1995. Male accessory gland substances modify the host-seeking behavior of gravid *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 41(11): 965-970.
- Fritz AH.** 2004. Sperm storage patterns in singly mated females of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 97(6): 1328-1335.
- Gilbert LI, Granger NA y Roe RM.** 2000. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30(8): 617-644.
- Gillott C.** 2003. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*. 48(1): 163-184.
- Gomez-Simuta Y y Teal PEA.** 2010. Hormonas juveniles y su aplicación en la Técnica del Insecto Estéril. *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*. Ed. Montoya P, Toledo J, Hernandez ES. Mexico. Pp. 357-368.
- Gruntenko NE, Karpova EK, Adonyeva NV, Chentsova NA, Faddeeva NV, Alekseev AA, et al.** 2005. Juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and dopamine interaction in *Drosophila virilis* reproduction under normal and nutritional stress conditions. *Journal of Insect Physiology*. 51(4): 417-425.
- Happ GM.** 1992. Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. *Annual Review of Entomology*. 37(1): 303-320.
- Haq I, Cáceres C, Hendrichs J, Teal PEA, Stauffer C y Robinson AS.** 2010a. Methoprene modulates the effect of diet on male melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, performance at mating aggregations. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 136(1): 21-30.

- Haq I, Cáceres C, Hendrichs J, Teal P, Wornoaiporn V, Stauffer C y Robinson AS.** 2010b. Effects of the juvenile hormone analogue methoprene and dietary protein on male melon fly *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) mating success. *Journal of Insect Physiology*. 56(11): 1503-1509.
- Haq I, Cáceres C, Liedo P, Soriano D, Jessup A, Hendrichs J, et al.** 2013. Effect of methoprene application, adult food and feeding duration on male melon fly starvation survival. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 61-68.
- Jaldo HE.** 2001. Estudios biológicos y poblacionales de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Jaldo HE, Willink E y Liedo P.** 2007. Demographic analysis of mass-reared *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Tucumán, Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. 84: 15–20.
- Klowden MJ.** 2007. Physiological systems in insects, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam.
- Kumaran N, Balagawi S, Schutze MK y Clarke AR.** 2013. Evolution of lure response in tephritid fruit flies: phytochemicals as drivers of sexual selection. *Animal Behaviour*. 85(4): 781-789.
- Liendo MC, Devescovi F, Bachmann GE, Utgés ME, Abraham S, Vera MT, et al.** 2013. Precocious sexual signalling and mating in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males achieved through juvenile hormone treatment and protein supplements. *Bulletin of Entomological Research*. 103(1): 1-13.
- Nijhout HF.** 1994. *Insect hormones*. Princeton University Press.
- Papadopoulos NT, Shelly TE, Niyazi N y Jang E.** 2006. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior*. 19: 403–418.
- Park Yi, Shu S, Ramaswamy SB y Srinivasan A.** 1998. Mating in *Heliothis virescens*: transfer of juvenile hormone during copulation by male to female and stimulation of biosynthesis of endogenous juvenile hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 38(2): 100-107.
- Pereira R, Sivinski J y Teal PE.** 2009. Influence of methoprene and dietary protein on male *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) mating aggregations. *Journal of Insect Physiology*. 55(4): 328-335.
- Pereira R, Sivinski J y Teal PE.** 2010. Influence of a juvenile hormone analog and dietary protein on male *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) sexual success. *Journal of economic Entomology*. 103(1): 40-46.
- Pereira R, Teal PEA, Conway H, Worley J y Sivinski J.** 2013. Influence of methoprene and dietary protein on maturation and sexual performance of sterile *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 191-199.
- Petit-Marty N, Vera MT, Calcagno G, Cladera JL, Segura DF, Allinghi A, et al.** 2004. Sexual behavior and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*. 97: 1320–1327.
- Pondeville E, Maria A, Jacques JC, Bourguoin C y Dauphin-Villemant C.** 2008. Anopheles gambiae males produce and transfer the vitellogenic steroid hormone 20-hydroxyecdysone to females during mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(50): 19631-19636.
- Pszczolkowski MA, Tucker A, Srinivasan A y Ramaswamy SB.** 2006. On the functional significance of juvenile hormone in the accessory sex glands of male *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology*. 52(8): 786-794.
- Rantala MJ, Vainikka A y Kortet R.** 2003. The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 270(1530): 2257-2261.
- Richard DS, Applebaum SW, Sliter TJ, Baker FC, Schooley DA, Reuter CC, et al.** 1989. Juvenile hormone bisepoxide biosynthesis in vitro by the ring gland of *Drosophila melanogaster*: a putative juvenile hormone in the higher Diptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(4): 1421-1425.
- Riddiford LM y Ashburner M.** 1991. Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *General and comparative endocrinology*. 82(2): 172-183.
- Ringo JM.** 2002. Hormonal regulation of sexual behavior in insects. *Hormones, brain and behavior*. (3): 93-114.

- Segura DF, Cáceres C, Vera MT, Wornoyaporn V, Islam A, Teal PE, et al.** 2009. Enhancing mating performance after juvenile hormone treatment in *Anastrepha fraterculus*: a differential response in males and females acts as a physiological sexing system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 131(1): 75-84.
- Segura DF, Utgés ME, Liendo MC, Rodríguez MC, Devescovi F, Vera M, et al.** 2013. Methoprene treatment reduces the pre-copulatory period in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 19–29.
- Shelly TE y McInnis DO.** 2001. Exposure to ginger root oil enhances mating success of irradiated, mass-reared males of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic Entomology*. 94(6): 1413-1418.
- Shelly TE, Edu J, Pahio E y Nishimoto J.** 2007. Scented males and choosy females: does male odor influence female mate choice in the Mediterranean fruit fly? *Journal of Chemical Ecology*. 33: 2308–2324.
- Shelly TE, Nishimoto JI y Edu J.** 2009. Influence of methoprene on the age-related mating propensity of males of the Oriental fruit fly and the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Florida entomologist*. 92(2): 193-198.
- Shu S, Park YI, Ramaswamy SB y Srinivasan A.** 1998. Temporal profiles of juvenile hormone titers and egg production in virgin and mated females of *Heliothis virescens* (Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*. 44(11): 1111-1117.
- Sirost LK, Poulson RL, McKenna MC, Girnary H, Wolfner MF y Harrington LC.** 2008. Identity and transfer of male reproductive gland proteins of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*: potential tools for control of female feeding and reproduction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38(2): 176-189.
- Sirost LK, Hardstone MC, Helinski ME, Ribeiro JM, Kimura M, Deewatthanawong P, et al.** 2011. Towards a semen proteome of the dengue vector mosquito: protein identification and potential functions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 5(3): e989.
- Teal PEA, Gomez-Simuta Y y Proveaux AT.** 2000. Mating experience and juvenile hormone enhance sexual signaling and mating in male Caribbean fruit flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(7): 3708-3712.
- Teal PEA y Gomez-Simuta Y.** 2002. Juvenile hormone: action in regulation of sexual maturity in Caribbean fruit flies and potential use in improving efficacy of sterile insect control technique for tephritid fruit flies. *IOBC wprs Bulletin*. pp. 25.
- Teal PEA, Pereira R, Segura DF, HaqI, Gómez-Simuta Y, Robinson AS y Hendrichs J.** 2011. Methoprene and protein supplements accelerate reproductive development and improve mating success of male tephritid flies. *Journal of Applied Entomology*. 1439-0418.
- Vogel W, Masner P, Graf O y Dorn S.** 1979. Types of response of insects on treatment with juvenile hormone active insect growth regulators. *Experientia*. 35(9): 1254-1256.
- Wilson TG, DeMoor S y Lei J.** 2003. Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the Methoprene-tolerant 27 mutant phenotype. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 33(12): 1167-1175.
- World Health Organization.** 2008. Guidelines for Drinking-Water Quality, 3rd edition. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/methoprenesum_2ndadd.pdf
- Wyatt GR y Davey KG.** 1996. Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone. II. Roles of Juvenile Hormone in Adult Insects. *Advances in insect physiology*. 26(1).
- Yin CM, Qin WH y Stoffolano Jr JG.** 1999. Regulation of mating behavior by nutrition and the corpus allatum in both male and female *Phormia regina* (Meigen). *Journal of Insect Physiology*. 45(9): 815-822.
- Zar J.** 1996. Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, NJ, USA, Prentice-Hall.

Capítulo 5

Beneficios directos asociados a la preferencia por machos expuestos a guayaba o tratados con metopreno por parte de las hembras de *Anastrepha fraterculus*

5.1. Introducción

El concepto de selección sexual fue definido originalmente por Charles Darwin en su libro “La descendencia del hombre y la selección en relación al sexo” para explicar el desarrollo de caracteres sexuales secundarios en los seres vivos que parecen no responder a la selección natural (Darwin 1871). Allí postula que algunos rasgos son el resultado de la competencia entre individuos de un mismo sexo para el acceso a la cópula (selección intrasexual) y de la selección por parte de uno de los sexos, usualmente las hembras, entre individuos del sexo opuesto (selección intersexual). Según Trivers (1972), la selección sexual puede ser comprendida teniendo presente el concepto de inversión parental, es decir, el esfuerzo biológico llevado a cabo por cada uno de los individuos integrantes de la pareja para concebir y criar su descendencia. En la mayor parte de las especies con reproducción sexual, la inversión parental suele ser mayor en hembras ya que estas suelen desarrollar gametas más grandes y con mayores reservas de nutrientes en comparación con las gametas masculinas. Asimismo, la hembra puede invertir en el desarrollo de embriones (Clutton-Brock *et al.* 1991) y en caso de existir cuidado parental, suele ser el sexo que invierte más tiempo y esfuerzo. Esto se traduce en una la tasa potencial de reproducción en las hembras menor que en los machos lo cual lleva a las hembras a elegir cuidadosamente cual será el padre de sus hijos ya que esta decisión condicionará la calidad genética de su descendencia. Por otro lado, los machos raramente rechazarán una cópula debido a que el costo de la inversión parental es mucho menor que el potencial beneficio de dejar descendencia. Así, los machos suelen tener una tasa reproductiva potencialmente mayor que las hembras y por lo tanto compiten por el acceso a estas (Clutton-Brock y Vincent 1991, Clutton-Brock y Parker 1992). En términos generales, cuantas más cópulas logre el macho mayor será el número de descendientes que obtendrá. Este esquema general es común en la mayoría de las especies de animales y principalmente en aquellas especies cuyo sistema de apareamiento es de tipo poligínico, donde un macho puede potencialmente reproducirse con varias hembras (Harré 1991). Para las especies cuyos machos forman leks se da un caso extremo de poliginia debido a que en este sistema de apareamiento unos pocos machos acaparan la mayoría de las cópulas y muchos otros no logran aparearse. En estos casos particulares, en donde la mayoría de las hembras coinciden en el macho con el cual aparearse, debe existir una fuerte presión de selección sobre los machos a favor del fenotipo que las hembras eligen y esta fuerza selectiva debería tener asociado algún beneficio para las hembras que se aparearon con dichos machos.

Por mucho tiempo se ha considerado que las hembras eligen a los machos en función de sus rasgos fenotípicos principalmente a través de tres (aunque existen variantes) posibles

mecanismos evolutivos que no son mutuamente excluyentes (Andersson 1994, Johnstone 1995, Ryan 1997, Wyatt 2003). Uno de estos mecanismos de selección sexual es comúnmente denominado “indicador de buenos genes” o simplemente “buenos genes”. En dicho caso, las hembras eligen a los machos en función de un rasgo fenotípico atractivo que resulta ser un indicador confiable de su calidad genética. Si los machos muestran una característica, por ejemplo olor intenso, en relación directamente proporcional a su salud y viabilidad, y esta característica es heredable, entonces aquellas hembras que elijan a machos con olores intensos pondrán sus propios genes en compañía de buenos genes en su descendencia. Un ejemplo de este mecanismo es el caso de las hembras de la polilla *Utetheisa ornatrix* L. (Lepidoptera: Arctiidae) donde las hembras eligen aparearse con machos grandes, usando como indicador de tamaño el olor de la feromona que estos emiten; las hijas heredan este carácter y al ser más grandes logran mayor fecundidad (Iyengar y Eisner 1999a). Por tanto, la feromona de los machos es un indicador confiable del tamaño de los mismos y las hembras que utilicen esta clave como indicador, obtendrán una progenie más fecunda. Este es un caso de beneficio indirecto para la hembra, debido a que al elegir un macho atractivo esta hembra no aumenta la capacidad de dejar descendientes, sino que aumenta la capacidad de que sus hijos dejen más descendientes. De esta manera, la hembra aumenta su *fitness* indirectamente. El segundo mecanismo es conocido como “selección autorreforzante de Fisher” (en honor a su original postulante, Ronald Fisher, en 1930) o “hijo atractivo”. En este caso, también resulta en un beneficio indirecto para la hembra, pero a diferencia del mecanismo de “buenos genes”, en este mecanismo se considera que el rasgo fenotípico del macho que lo hace atractivo a las hembras no está asociado a ninguna característica beneficiosa para la hembra. Las hembras los eligen simplemente porque en la población se fijó el comportamiento de preferencia por machos con ese rasgo atractivo. Esta es una selección autorreforzante, generación tras generación, ya que tanto la característica atractiva del macho, como el comportamiento de preferencia por machos atractivos por parte de las hembras son heredables, por lo que los hijos tendrán altas probabilidades de conservar esa característica y las hijas de mantener la preferencia por ese tipo de macho. El único beneficio aparente que obtiene la hembra por elegir a un macho atractivo es que sus hijos tendrán mayores probabilidades de heredar esa característica atractiva del padre y por lo tanto serán preferidos por las hembras de la siguiente generación. Sin embargo, hasta el que tal vez sea el caso más exagerado y conocido, como es el de la cola del macho del pavo real, debería tener un límite de expresión. Iwasa y Pomiankowski (1995) propusieron que ese límite debería estar impuesto por los costos que deben soportar los machos (por ejemplo, en la supervivencia) y las hembras (por ejemplo, la búsqueda de los mejores machos conllevaría un alto costo energético y de supervivencia). Así,

se llegaría a un límite definido por la relación entre costos y beneficios en ambos sexos (Contreras-Garduño *et al.* 2009). Un ejemplo del mecanismo del “hijo atractivo” ocurre en *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), una especie de jején americano en la que las hembras seleccionan activamente a los machos en función de la calidad de la feromona que liberan, pero la naturaleza de esta elección pareciera no estar asociada a un beneficio para las hembras (Jones *et al.* 1998). Aunque no pudieron descartar totalmente otros beneficios, los autores concluyeron que el mecanismo del “hijo atractivo” parece ser el responsable del mantenimiento de la selección por parte de las hembras. Una alternativa al modelo de Fisher es conocido como el principio del “handicap” (Zahavi 1975, 1977). Este modelo sugiere que los rasgos fenotípicos exagerados del macho (el mismo que los hace atractivos para las hembras) son indicadores de la “condición” o “buenos genes” del macho porque impiden el desempeño de estos y demuestran su capacidad para superar ese impedimento (Contreras-Garduño *et al.* 2009). Al elegir a las mejores parejas, las hembras podrían tener hijos de mejor estado fisiológico que les permite estar bien alimentados, evitar predadores, parásitos, enfermedades, etc. Para evitar que cualquier macho pueda desarrollar los rasgos fenotípicos atractivos para las hembras, la señalización de la condición del macho debe ser honesta (costosa de producir). Así, sólo los machos con mejor condición logran producir estos rasgos atractivos. Para estos dos primeros mecanismos de selección sexual el fenómeno de elección de las hembras por los mejores machos se encuentra relacionado únicamente con beneficios indirectos debido a que las hembras incrementan su *fitness* por pasar a sus hijos los rasgos fenotípicos de esos buenos machos elegidos (Fedorka y Mousseau 2002). Por otro lado, el tercer mecanismo se corresponde con un “beneficio directo” para las hembras que eligen a los mejores machos, y es considerado directo debido a que su *fitness* se ve mejorado no por pasar genes buenos a sus hijos, sino por un incremento de su propia supervivencia, fecundidad o algún otro rasgo (Gwynne 1984, Reinhold 1999, Arnqvist y Nilsson 2000). Este es el caso, por ejemplo de la elección de machos sin enfermedades contagiosas o de machos que ofrecen regalos nupciales, como por ejemplo, alimento, refugio, buen sitio para el desarrollo de sus hijos y transferencia de productos de glándulas sexuales accesorias, con el único fin de que las hembras los acepten para la cópula. Al igual que para el mecanismo de “buenos genes”, se espera que la elección se base en la percepción de señales honestas. En resumen, la selección sexual puede conferir beneficios indirectos a la hembra mediante un incremento del *fitness* de la descendencia (debido a la selección de un buen padre por parte de la madre) (Fedorka y Mousseau 2002) o beneficios directos al incrementar su propia fecundidad y longevidad (Gwynne 1984, Reinhold 1999, Arnqvist y Nilsson 2000, Kumaran *et al.* 2013a).

Los mecanismos anteriores explican cómo pueden existir los rasgos fenotípicos de los machos que son preferidos por las hembras, pero no explican su origen (Shelly 2000b, Wyatt 2003, Contreras-Garduño *et al.* 2009). Se ha propuesto una hipótesis denominada “sesgo sensorial” (Basolo 1990, Christy y Backwell 1995) o “trampa sensorial” (West-Eberhard 1984) para la cual los machos desarrollan los rasgos atractivos que explotan canales sensorialmente ya sesgados y preexistentes en las hembras (Ryan 1990, 1998, Endler 1992). Estos sesgos habrían evolucionado mediante otras vías fuera del contexto de apareamiento y los machos son capaces de explotarlos y de esta forma obtienen mayores probabilidades de aparearse. Un claro ejemplo es el caso de los peces de acuario pertenecientes a la familia Goodeidae en la que durante el cortejo, los machos mueven sus aletas caudales de tal forma que el movimiento se asemeja a una presa (gusano o larva) y las hembras se acercan a los machos que mejor pueden imitar a ese presunto alimento. De esta forma, mediante la explotación de un contexto de alimentación pre-sesgado en las hembras los machos con estos rasgos fenotípicos obtienen más probabilidades de fecundar los huevos (Rodd *et al.* 2002, Macías-García y Ramírez 2005). Esta “trampa sensorial” podría ser tan costosa de mantener que se vuelve una señal de condición masculina (Macías-García y Ramírez 2005). En el caso de las moscas tefrítidas, podría existir un sesgo sensorial en las hembras relacionado con la búsqueda de fuentes de alimento o sustratos de oviposición (frutos) en la que los machos que poseen los aromas característicos de estas fuentes atraerían más hembras (Shelly 2000b, Kumaran *et al.* 2013a).

La preferencia de pareja por parte de las hembras sobre la base de un beneficio directo es probablemente el mecanismo más fácil de verificar ya que se comprueba en la propia generación. En el caso de la polilla *U. ornatrix*, además de los beneficios indirectos en las hembras comentados anteriormente, también existen claras evidencias de beneficios directos (Wyatt 2003). Esta especie, en su estado larval se alimenta de plantas que generalmente contienen alcaloides tóxicos para la mayoría de sus predadores (González *et al.* 1999). Los machos más grandes serán los mejores alimentados y con mayores reservas de alcaloides que son transferidos a las hembras durante la cópula (Iyengar y Eisner 1999b). Por lo tanto, las hembras que se apareen con estos machos tendrán mayores concentraciones de alcaloides y mayores probabilidades de sobrevivir al ataque de predadores. Asimismo, se verá reducida la probabilidad de predación de sus huevos debido a la presencia de toxinas en el mismo. El resultado final será por lo tanto mayor descendencia para la hembra como resultado de beneficios directos e indirectos (Iyengar y Eisner 1999a). Otro caso de beneficio directo en hembras se da cuando los machos de algunas especies de insectos emiten señales feromonales que tienden a estar asociadas con parches de recursos necesarios para las hembras (Landolt

1997). A diferencia de la hipótesis del sesgo sensorial en moscas tefritidas, en la cual se postula que los machos con olores a frutos se aprovechan de un canal sensorial preexistente en las hembras, en este caso los machos se apoderan y defienden estos recursos frente a otros machos y comienzan el llamado sexual y las hembras que arriban obtienen el apareamiento y los recursos en un mismo lugar. Este es el caso de la mosca de la fruta *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker (Diptera: Tephritidae), en la que los machos llaman cerca de frutos, los cuales son sitios de oviposición (Landolt *et al.* 1992). Otro de los cuerpos de investigación sobre los beneficios en moscas tefritidas es la inducción del período refractario (tiempo transcurrido entre la primer y segunda cópula de las hembras). Los machos que transfieran más y/o mejor calidad de esperma y de productos secundarios inducirán mayores períodos refractarios en las hembras quienes se benefician debido a que disminuyen la necesidad de nuevas cópulas y así el riesgo de enfermedades de transmisión sexual y de predación durante el apareamiento (Abraham *et al.* 2013). Esto posee asociado también un beneficio para los machos ya que las hembras fecundarán más huevos con su esperma.

La selección sexual, los rasgos y atributos involucrados y los mecanismos subyacentes son foco de estudio en muchas especies de insectos incluyendo a moscas de la familia Tephritidae, la cual presenta una amplia gama de sistemas de apareamiento y estrategias reproductivas. Sin embargo, no todos estos aspectos están estudiados con igual profundidad y en el caso puntual de la presencia de beneficios directos asociados a la elección de pareja existen escasos trabajos concluyentes. Por ejemplo, las hembras de *A. suspensa* prefieren aparearse con machos grandes y se ha postulado (pero no demostrado) que esta preferencia se debe a que los machos de mayor tamaño son capaces de transferir mayor cantidad de sustancias beneficiosas durante la cópula (Sivinski 1993). En *A. ludens*, Aluja *et al.* (2008) observaron que las hembras discriminan fuertemente entre machos alimentados con dietas de baja y alta calidad nutricional, eligiendo preferencialmente a estos últimos. Lo mismo ocurrió en el caso de *C. capitata* (Yuval *et al.* 2002, Gavriel *et al.* 2010). De todos estos casos, solamente Gavriel *et al.* (2010) encontraron evidencia de un beneficio directo para la hembra a través de la inducción de un mayor periodo refractario por parte de los machos mejor alimentados. En ninguno de los casos mencionados se han encontrado evidencia de beneficios directos en términos de fecundidad o fertilidad en hembras apareadas con los machos preferidos. Asimismo, los machos son preferidos por las hembras cuando ingieren compuestos de ciertas plantas (o compuestos análogos), como sucede en algunas especies del género *Bactrocera* (Shelly y Dewire 1994, Tan y Nishida 1996, Shelly 2000a,b, Shelly y Nishida 2004, Wee *et al.* 2007, Ji *et al.* 2013, Orankanok *et al.* 2013, Kumaran 2013a,b). Sin embargo,

solamente Shelly (2000b) y Shelly y Nishida (2004) con *B. dorsalis* y Kumaran *et al.* (2013a,b) con *B. tryoni* estudiaron beneficios asociados a esa preferencia. En los casos de Shelly (2000b), Shelly y Nishida (2004) y Kumaran *et al.* (2013b), no se encontraron evidencias de beneficios directos asociados a una mayor fecundidad o fertilidad. Los autores sugirieron que, en ausencia de beneficios directos, la preferencia de las hembras sería adjudicable a beneficios indirectos del tipo “hijo sexy” o del “sesgo sensorial” (Shelly 2000b, Kumaran *et al.* 2013b). Por otro lado, Kumaran *et al.* (2013a), encontraron que las hembras apareadas con machos alimentados con cuelure y zingerone presentaron mayor fecundidad que las que se aparearon con machos no alimentados con estos compuestos. En moscas de los frutos de la familia Tephritidae este es el único antecedente en el que se encontró una clara evidencia de un beneficio directo relacionado con una mayor fecundidad para las hembras apareadas con los machos que eligieron.

Se sabe que en moscas tefritidas, las hembras prefieren aparearse con machos expuestos a ciertos volátiles de origen vegetal. Los machos de *C. capitata* son preferidos por las hembras para el apareamiento cuando son expuestos al aceite de la raíz del jengibre (ARJ) (Shelly y McInnis 2001, Shelly *et al.* 2003, Shelly 2005, Papadopoulos *et al.* 2006), al aceite de cáscara de naranja u otros cítricos (Shelly *et al.* 2004, 2008a), mezclas de compuestos de cítricos (Kouloussis *et al.* 2010), al compuesto α -copeno (Shelly 2001, 2007b) y al aceite del árbol de té, *Melaleuca alternifolia* (Maiden y Betch) (Myrtales: Melastomataceae) (Shelly y Epsky 2015). Sin embargo, solamente en dos de estos casos se investigó sobre los beneficios asociados a la preferencia de las hembras. Shelly (2005) no encontró beneficios directos para las hembras relacionados con la fecundidad, fertilidad y longevidad y atribuyó la preferencia a beneficios indirectos. Por otro lado, Morelli *et al.* (2013) observaron que las hembras apareadas con los machos expuestos presentaron mayor período refractario. En el caso de las moscas pertenecientes al género *Anastrepha* son pocos los antecedentes en los que se ha estudiado el impacto de la exposición a volátiles de origen vegetal en el éxito reproductivo de los machos. En el caso más reciente (Morató *et al.* 2015) observaron que la exposición de los machos a volátiles de naranjas provocó una mayor aceptación por parte de las hembras en *A. ludens*. Flores *et al.* (2011) observaron que las hembras de *A. serpentina* prefirieron aparearse con machos expuestos al ARJ y, Vera *et al.* (2013) registraron el mismo fenómeno para machos de *A. fraterculus* expuestos a volátiles del fruto de la guayaba. No obstante, en ninguno de estos sistemas se registran antecedentes de estudios relacionados con los beneficios que obtienen las hembras por realizar esta selección.

En el Capítulo 2 de esta tesis se demostró que las hembras de *A. fraterculus* eligen a machos expuestos a volátiles de guayaba por sobre machos no expuestos y lo mismo ocurre en machos tratados con metopreno (Capítulo 4), pero se desconoce el significado adaptativo de esa elección. Con todo lo expuesto hasta aquí, se entiende que debe existir una fuerte presión de selección en las hembras que las hace discriminar entre machos con distintas características y que esa fuerza selectiva puede estar relacionada con un beneficio directo, como fue observado por Kumaran *et al.* (2013a) o indirecto (Shelly 2005, Kumaran 2013b) de las hembras por aparearse con los mejores machos. Siguiendo la línea de investigación de otras especies, en este capítulo se evalúa si la preferencia de las hembras por machos con determinadas características que los hacen más atractivos es debida a un beneficio directo para la hembra. Específicamente, se investiga si las hembras que eligen machos expuestos a volátiles de guayaba o tratados con metopreno ven incrementada su fecundidad o su fertilidad (porcentaje de eclosión de esos huevos) o bien experimentan una reducción del periodo pre-oviposicional. En el caso específico del metopreno se investigan también los beneficios para hembras de distintas edades y, por último, si el tratamiento de las hembras con metopreno tiene algún impacto sobre su fecundidad, fertilidad o período pre-oviposicional.

5.1.1. Objetivos

Objetivo general

Determinar si la preferencia de las hembras por machos expuestos a guayaba o tratados con metopreno se debe a un beneficio directo relacionado con la fecundidad o fertilidad.

Objetivos específicos

- 1- Determinar si la preferencia de machos expuestos a volátiles de guayaba por parte de las hembras se debe a un beneficio directo sobre su fecundidad y/o fertilidad.
- 2- Determinar si la preferencia de machos tratados con metopreno por parte de las hembras se debe a un beneficio directo sobre su fecundidad y/o fertilidad.
- 3- Evaluar posibles beneficios directos en hembras de distintas edades apareadas con machos tratados con metopreno.
- 4- Determinar si las hembras tratadas con metopreno presentan un incremento en su fecundidad y/o fertilidad.

5.2. Materiales y Métodos

Todos los individuos utilizados en los experimentos descritos a continuación provinieron de la cría de laboratorio del IGAEF, INTA, Castelar y fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas (T: 24 ± 2 °C, RH: $70 \pm 10\%$ y un fotoperiodo de luz/oscuridad de 12hs). Las hembras fueron alimentadas con una dieta a base de azúcar, hidrolizado de levadura (MP Biomedicals, San Francisco, California, EE.UU.) e hidrolizado de maíz (ARCOR, Tucumán) con proporciones en peso 4:1:1, respectivamente (Jaldo *et al.* 2001, Vera *et al.* 2007). La dieta de los machos consistió en azúcar y levadura de cerveza (CALSA, Tucumán) con una proporción en peso de 3:1, respectivamente.

5.2.1. EXPERIMENTO 1. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos expuestos a volátiles de guayaba

Para determinar si las hembras de *A. fraterculus* obtienen un beneficio directo cuando se aparean con machos expuestos a volátiles de guayaba, se comparó la fecundidad (número de huevos), el patrón temporal de oviposuras y la fertilidad (porcentaje de eclosión de esos huevos) entre hembras apareadas con machos expuestos a guayaba y hembras apareadas con machos no expuestos.

Los machos fueron expuestos a volátiles de frutos de guayaba según el procedimiento detallado en el Capítulo 2. Como control se utilizaron machos no expuestos. Cuando los individuos de ambos sexos alcanzaron los 10-12 días de edad, se realizó una prueba de apareamiento consistente en arenas experimentales en las que se colocó un macho expuesto, un macho no expuesto y una hembra, siendo vírgenes los 3 individuos. La prueba de apareamiento fue idéntica a la descrita en el Capítulo 2. Las hembras que alcanzaron el apareamiento fueron seleccionadas para el estudio de fecundidad y fertilidad descrito a continuación. Las hembras no apareadas y todos los machos (apareados o no) fueron descartados.

Se identificó a las hembras según el tipo de macho con el que se aparearon y se las colocó en frascos de vidrio de 3 L, en grupos de a 3, con agua y alimento. A partir de ese momento (día 10-12 post-emergencia) y aproximadamente cada 2 días durante un período de 37 días, cada grupo de hembras fue provisto con una unidad de oviposición la cual consistió en un recipiente plástico de 10 ml lleno con agua coloreada con colorante alimentario rojo (Fleibor, Tablada, Buenos Aires) y cubierta con Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging,

Chicago, Illinois, EE.UU.) (Figura 5.1). Este dispositivo es utilizado de manera efectiva en la cría de laboratorio del IGAEF, INTA Castelar. Tras 24 horas la unidad de oviposición se retiró y se recuperaron los huevos utilizando una pipeta plástica. Estos fueron transferidos sobre un papel de filtro negro el cual fue humedecido previamente. El papel de filtro con los huevos fue finalmente colocado dentro de una caja de Petri plástica (2 cm de alto y 8 cm de diámetro) con tapa y una base de tela húmeda para evitar la desecación (Figura 5.2). Las cajas de Petri fueron colocadas en cámaras a 25 ± 1 °C y $70\pm 10\%$ de HR durante 4 días para permitir el desarrollo embrionario. Pasado este tiempo se realizó el conteo de huevos y el registro de eclosión, utilizando una lupa con aumento 2x. Las variables registradas fueron: número de huevos totales y número de huevos eclosionados. Estos valores fueron usados para calcular: 1-el número promedio de huevos depositados por hembra por día (fecundidad); 2- el porcentaje de eclosión promedio (fertilidad). El número de réplicas fue 31 para hembras apareadas con machos expuestos a guayaba y 26 para hembras apareadas con machos no expuestos (ver Tabla 5.1).



Figura 5.1. Unidad de oviposición. Frasco con la unidad de oviposición (derecha).



Figura 5.1. Caja de Petri con papeles de filtro negro en donde se colocaron los huevos.

5.2.2. EXPERIMENTO 2. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos tratados con metopreno

Para determinar si la preferencia de las hembras de *A. fraterculus* por machos tratados con metopreno está asociada a un beneficio directo, se compararon las mismas variables que en el experimento 1 siendo, en este caso, entre hembras que se aparearon con machos tratados con metopreno y hembras que se aparearon con machos no tratados. Además, en este experimento, la comparación entre hembras apareadas con machos tratados y no tratados se realizó tanto para hembras jóvenes (10-12 días post-emergencia) como para hembras de edad avanzada (22-24 días post-emergencia).

Los machos fueron tratados con la solución de metopreno en acetona ($5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) el día de su emergencia (ver detalles en el Capítulo 4). Cuando las hembras alcanzaron los 10-12 días de edad (hembras jóvenes) y 22-24 días (hembras de edad avanzada) se las utilizó para realizar pruebas de apareamiento que se realizaron con machos de 10-12 días post-emergencia en todos los casos. Para ello se armaron arenas experimentales en las que se colocó un macho tratado, un macho no tratado y una hembra, siendo vírgenes los 3 individuos. Las pruebas de apareamiento fueron idénticas a la del experimento 1 y se detallan en el Capítulo 2 (sección 2.2.2.1). Las hembras que se aparearon fueron utilizadas para el estudio de fecundidad y fertilidad que se describe a continuación. Las hembras no apareadas y todos los machos (apareados o no) fueron descartados.

Se identificaron las hembras en 4 categorías según su edad (joven o de edad avanzada) y según el tipo de macho con el que se aparearon (tratado o no tratado). Posteriormente, se las colocó en grupos de 3 hembras (respetando las categorías) en recipientes plásticos de 1 L (réplica), con agua y alimento. A partir de ese momento (día 10-12 post-emergencia para hembras jóvenes y 22-24 para hembras de edad avanzada) y aproximadamente cada 2 días durante un período de 13 días, cada grupo de hembras fue provisto con una unidad de oviposición (las mismas que en experimento 1) para que puedan depositar sus huevos. Se siguió el mismo protocolo de colecta e incubación de huevos y registro de variables que en el experimento 1. El número de réplicas fue de 12 para hembras apareadas con machos tratados y de 9 para hembras apareadas con machos no tratados, tanto para hembras jóvenes como para hembras de edad avanzada (ver Tabla 5.1).

5.2.3. EXPERIMENTO 3. Fecundidad y fertilidad de hembras tratadas con metopreno

Con el fin de determinar si el hipotético incremento de la fecundidad y/o fertilidad de las hembras apareadas con machos tratados con metopreno (correspondiente al experimento 2) podría deberse a la transferencia de hormona juvenil(o metopreno) durante la cópula, se realizó un experimento en el cual el tratamiento con la solución de metopreno en acetona (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se aplicó directamente sobre las hembras, el día de su emergencia. Ningún macho fue tratado y como control se utilizaron hembras no tratadas.

El día de la emergencia, luego del tratamiento sobre las hembras, se armaron frascos de vidrio de 3 L con 5 hembras (tratadas o no tratadas) y 5 machos (siempre no tratados) (réplica). Tanto machos como hembras fueron alimentados con la dieta a base de azúcar, hidrolizado de levadura e hidrolizado de maíz (el mismo suministrado a las hembras de los experimentos 1 y 2). A partir del día 3 post-emergencia y aproximadamente cada 2 días durante un período de 24 días, cada grupo de 5 hembras y 5 machos fue abastecido con una unidad de oviposición (las mismas que las de los experimentos 1 y 2) para que las hembras puedan depositar sus huevos. Se siguió el mismo protocolo de colecta e incubación de huevos y registro de variables que en el experimento 1 y 2. El número de réplicas fue 10 para hembras tratadas y 10 para hembras no tratadas (ver Tabla 5.1).

5.2.4. Análisis de datos

En los experimentos 1 y 2 la preferencia de las hembras para el apareamiento se analizó mediante una prueba de bondad de ajuste de G (Zar 1996). En los experimento 1 y 3 las variables de fecundidad y fertilidad fueron comparadas entre hembras de ambos tratamientos mediante una prueba t de Student. En el experimento 2, las variables de fecundidad y fertilidad fueron comparadas entre las hembras de los 4 tratamientos mediante un ANOVA de 2 vías, en el que los factores fueron la edad de la hembra (joven o de edad avanzada) y el tipo de macho (tratado con metopreno o no tratado). En todos los casos se comprobaron los supuestos correspondientes a cada prueba estadística (y normalidad para las pruebas de t y normalidad y homocedacia para los ANOVAs).

Tabla 5.1. Resumen de las condiciones de cada tratamiento.

EXP.*	Tratamiento de hembras	Edad de las hembras**	Hembras apareadas con machos	Número de hembras por réplica	Número de réplicas
1	no tratadas	10-12	expuestos a guayaba	3	31
		10-12	no expuestos	3	26
2	no tratadas	10-12 (jóvenes)	tratados	3	12
			no tratados	3	9
		22-24 (edad avanzada)	tratados	3	12
			no tratados	3	9
3	tratadas	3	no tratados	5	10
	no tratadas	3	no tratados	5	10

* Experimento. ** Edad de las hembras al comienzo del registro de las oviposturas (días post-emergencia).

5.3. Resultados

5.3.1. Experimento 1. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos expuestos a volátiles de guayaba

En la prueba de apareamiento, las hembras prefirieron aparearse con machos expuestos a volátiles de guayaba (61,2% de apareamientos con machos expuestos; Prueba de $G_1=19,73$; $p<0,001$). La fecundidad de las hembras apareadas con machos expuestos fue significativamente mayor que la de hembras apareadas con machos no expuestos ($t_{55}=2,323$; $p=0,024$) (Figura 5.3a). Por su parte, la fertilidad fue similar entre ambos tipos de hembras ($t_{55}=1,321$; $p=0,192$) (Figura 5.3b). La dinámica de las posturas mostró que para la mayoría de los días, las hembras apareadas con machos expuestos oviponen más que las apareadas con machos no expuestos y la tendencia se mantiene relativamente constante hasta el fin del experimento, cercano al día 50 post-emergencia (Figura 5.4). Sin embargo, la eclosión de huevos no mostró ningún patrón claro, siendo relativamente constante a lo largo de los días para ambos tipos de hembras (Figura 5.5).

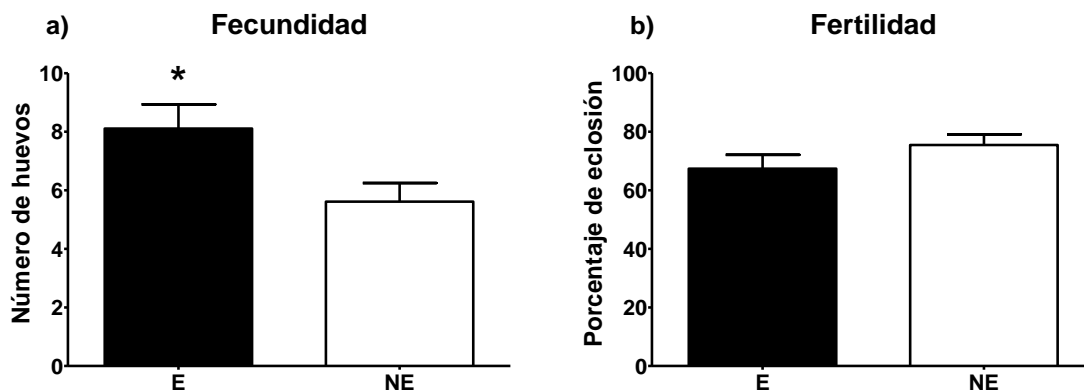


Figura 5.3. Resultados del experimento 1. a) Promedio diario del número de huevos depositados por hembra (fecundidad); b) Porcentaje de eclosión promedio (fertilidad). Las barras representan el error estándar de la media. El asterisco indica diferencias significativas ($p<0,05$) para la prueba t de Student. Referencias. E: hembras apareadas con machos expuestos a volátiles de guayaba; NE: hembras apareadas con machos no expuestos.

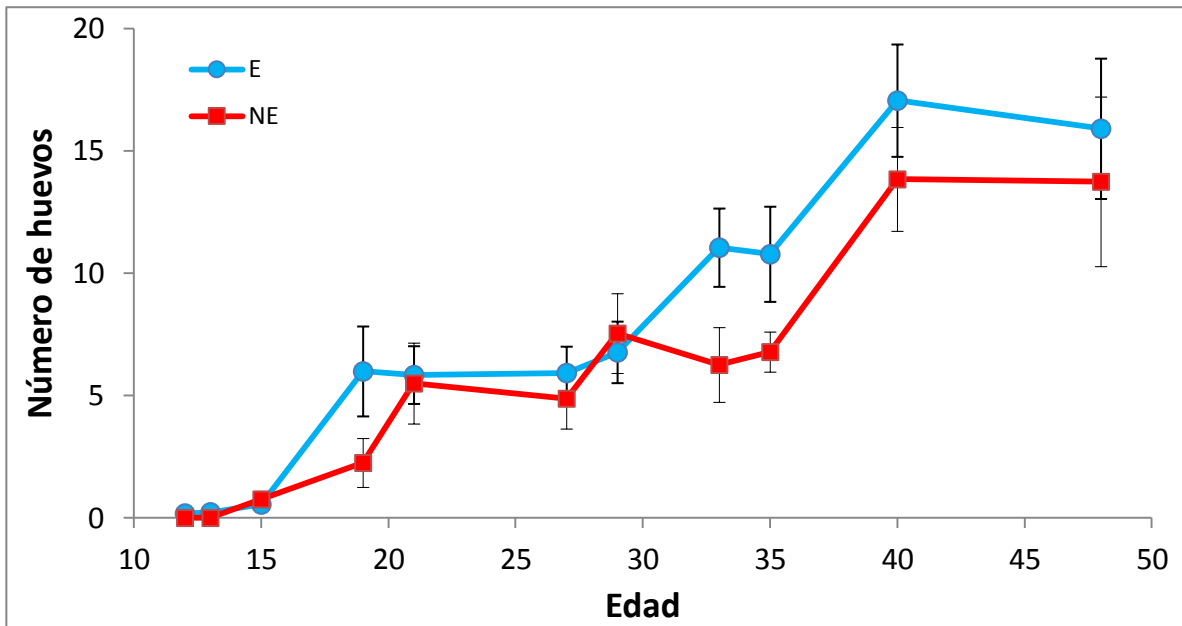


Figura 5.4. Patrón temporal de oviposición correspondiente al experimento 1. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el promedio diario del número de huevos depositados por hembra. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. Referencias. E: hembras apareadas con machos expuestos a volátiles de guayaba; NE: hembras apareadas con machos no expuestos.

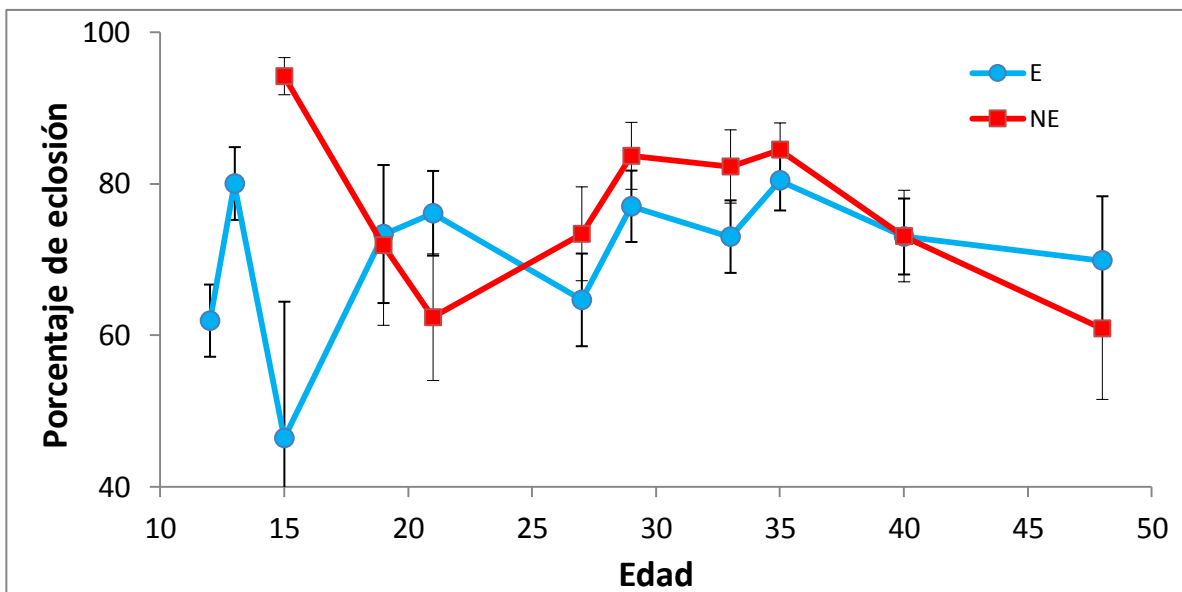


Figura 5.5. Patrón temporal de eclosión de huevos correspondiente al experimento 1. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el porcentaje promedio de huevos eclosionados. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. Los primeros dos días de registro la cantidad de huevos depositados por hembras apareadas con machos expuestos fue escasa y fue nula para hembras apareadas con machos no expuestos. Referencias. E: hembras apareadas con machos expuestos a volátiles de guayaba; NE: hembras apareadas con machos no expuestos.

5.3.2. EXPERIMENTO 2. Fecundidad y fertilidad de hembras apareadas con machos tratados con metopreno

En la prueba de apareamiento, las hembras prefirieron aparearse con machos tratados. Esto fue así tanto para hembras jóvenes (60,9% de apareamientos con machos tratados; Prueba de $G_1=7,272$; $p<0,01$), como para hembras de edad avanzada (59,0% de apareamientos con machos tratados; Prueba de $G_1=4,723$; $p=0,03$). La fecundidad no se vio afectada ni por el origen del macho (factor tipo de macho: $F_{3,40}=0,004$; $p=0,949$) ni por la edad de la hembra (factor edad de hembra: $F_{3,40}=0,434$; $p=0,514$) (Figura 5.6a). Asimismo, la interacción entre ambos factores fue no significativa ($F_{3,40}=0,131$; $p=0,719$). La fertilidad tampoco fue afectada por el origen del macho (factor tipo de macho: $F_{3,40}=1,555$; $p=0,220$) ni por la edad de la hembra (factor edad de hembra: $F_{3,40}=0,783$; $p=0,190$) (Figura 5.6b). La interacción entre ambos factores fue no significativa ($F_{3,40}=0,688$; $p=0,412$). La dinámica de las posturas mostró que las hembras de ambos tratamientos presentan un patrón de oviposturas similar tanto en hembras jóvenes (Figura 5.7) como en hembras de edad avanzada (Figura 5.8). La dinámica de eclosión de huevos mostró el mismo patrón en ambos tratamientos, aunque en parte del período se observan valores ligeramente mayores para hembras apareadas con machos no tratados. Esto se observa tanto en hembras jóvenes (Figura 5.9) como en hembras de edad avanzada (Figura 5.10).

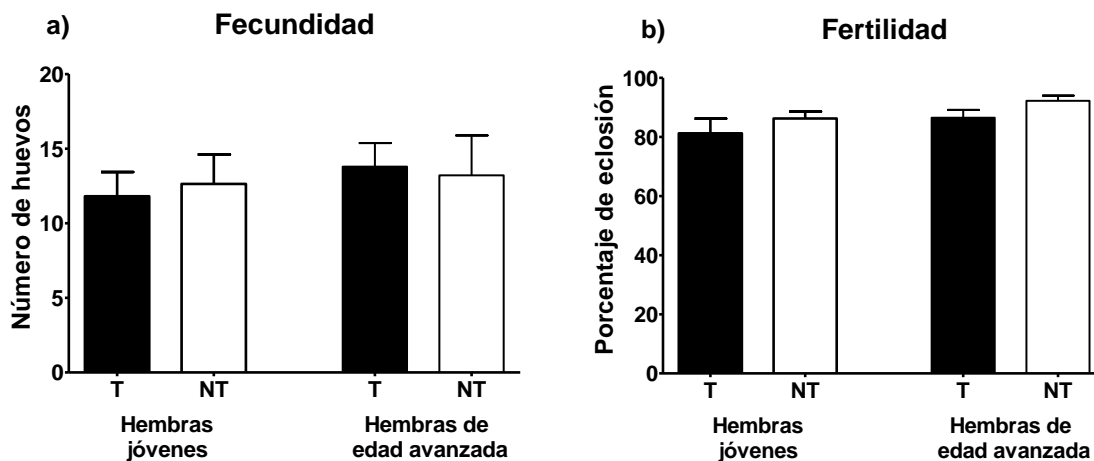


Figura 5.6. Resultados del experimento 2. a) Promedio diario del número de huevos depositados por hembra (fecundidad) para hembras jóvenes y hembras de edad avanzada; **b)** Porcentaje de eclosión promedio (fertilidad) para hembras jóvenes y hembras de edad avanzada. Las barras representan el error estándar de la media. Referencias. T: hembras apareadas con machos tratados con metopreno; NT: hembras apareadas con machos no tratados.

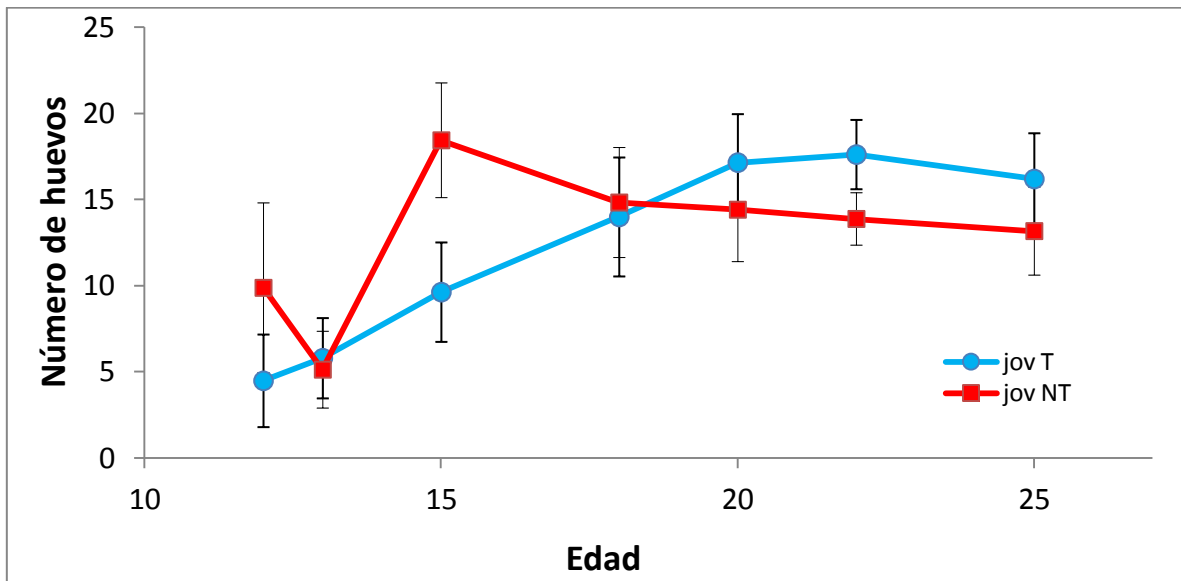


Figura 5.7. Patrón temporal de oviposición correspondiente a hembras jóvenes del experimento 2. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el promedio diario del número de huevos depositados por hembra. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. Referencias. *jov T*: hembras jóvenes apareadas con machos tratados con metopreno; *jov NT*: hembras jóvenes apareadas con machos no tratados.

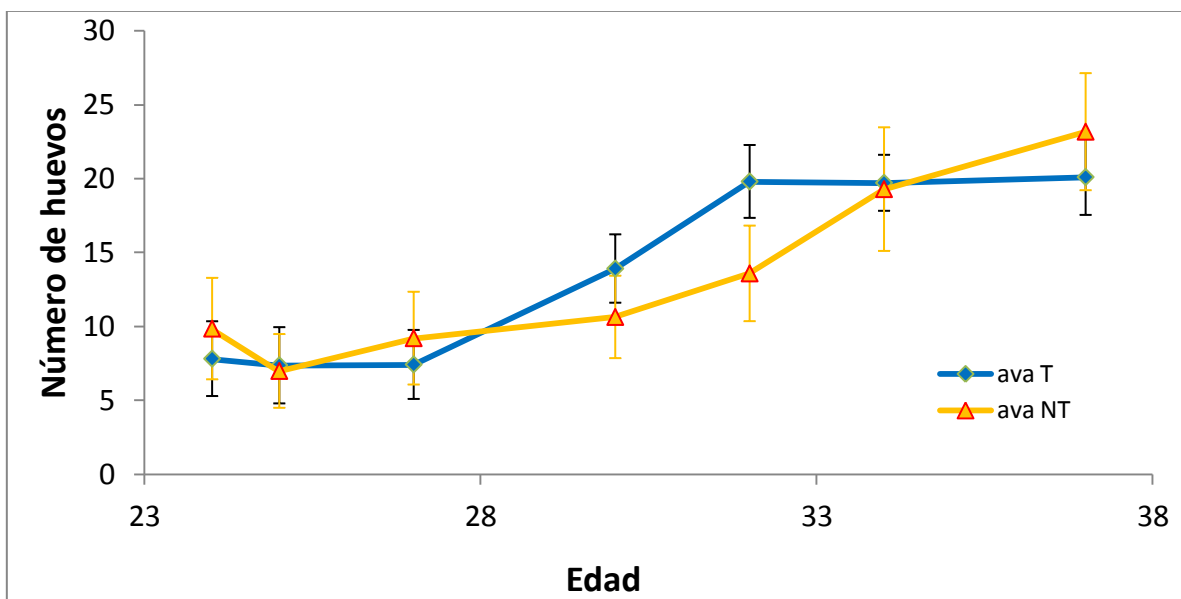


Figura 5.8. Patrón temporal de oviposición correspondiente a hembras de edad avanzada del experimento 2. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el promedio diario del número de huevos depositados por hembra. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. Referencias. *ava T*: hembras de edad avanzada apareadas con machos tratados con metopreno; *ava NT*: hembras de edad avanzada apareadas con machos no tratados.

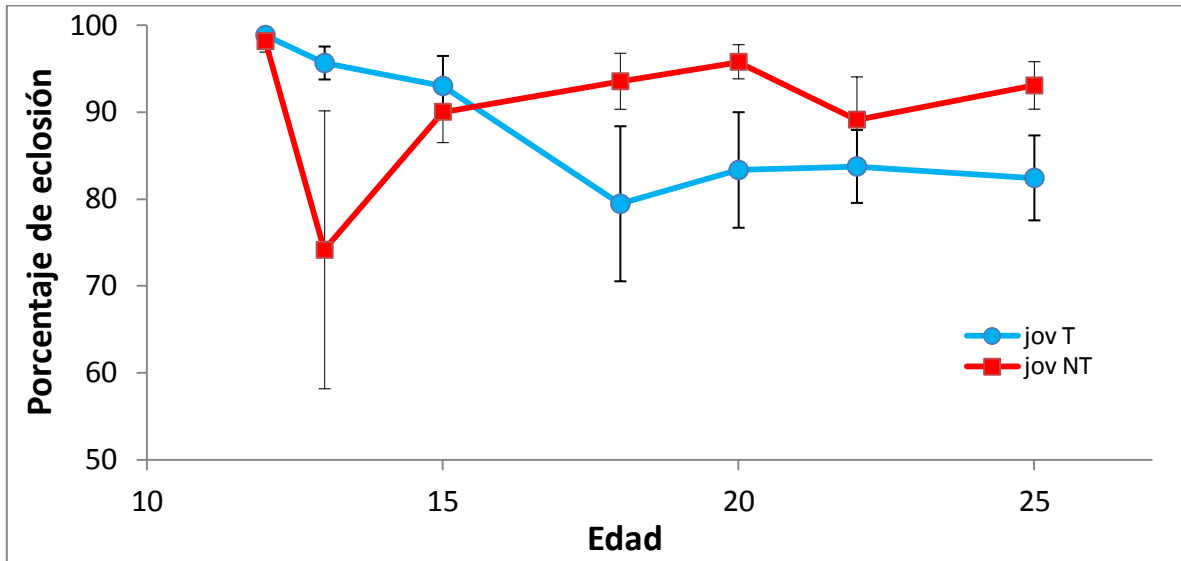


Figura 5.9. Patrón temporal de eclosión de huevos correspondiente a hembras jóvenes del experimento 2. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el porcentaje promedio de huevos eclosionados. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. Referencias. *jov T*: hembras jóvenes apareadas con machos tratados con metopreno; *jov NT*: hembras jóvenes apareadas con machos no tratados.

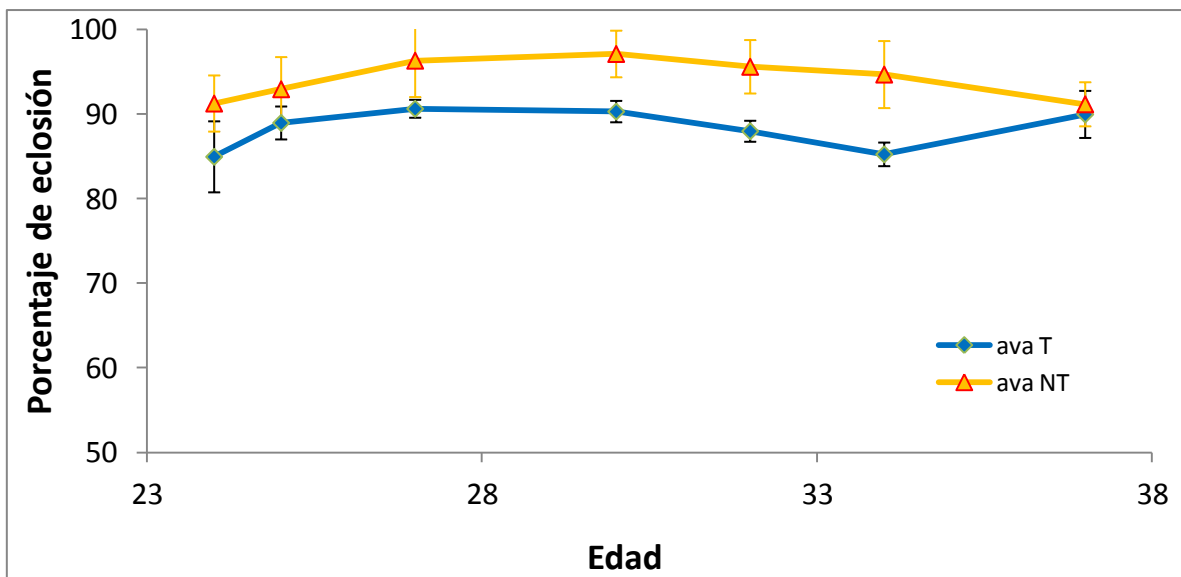


Figura 5.10. Patrón temporal de eclosión de huevos correspondiente a hembras de edad avanzada del experimento 2. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el porcentaje promedio de huevos eclosionados. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. Referencias. *ava T*: hembras de edad avanzada apareadas con machos tratados con metopreno; *ava NT*: hembras de edad avanzada apareadas con machos no tratados.

5.3.3. EXPERIMENTO 3. Fecundidad y fertilidad de hembras tratadas con metopreno

La fecundidad de las hembras tratadas con metopreno y la de las hembras no tratadas (en ambos caso apareadas con machos no tratados) no difirieron significativamente ($t_{14}=0,116$; $p=0,909$) (Figura 5.11a). La fertilidad tampoco fue significativamente diferente entre hembras de ambos tratamientos ($t_{14}=0,437$; $p=0,669$) (Figura 5.11b). Cuatro de las réplicas armadas para las hembras tratadas debieron ser descartadas debido a la nula oviposición registrada en esas replicas, quedando para el análisis 6 réplicas para hembras tratadas y 10 réplicas para hembras no tratadas. La dinámica de las posturas de huevos no mostró una tendencia clara y ambos tipos de hembras presentaron un patrón de oviposición similar (Figura 5.12). Lo mismo ocurrió para la dinámica de eclosión de los huevos para el cual ambas curvas no mostraron diferencias (Figura 5.13). Durante los tres primeros días de registro (edades de 4, 6 y 7 días) no se observaron huevos para ninguno de los dos tratamientos, por lo que no se los tuvo en cuenta para el registro de eclosión.

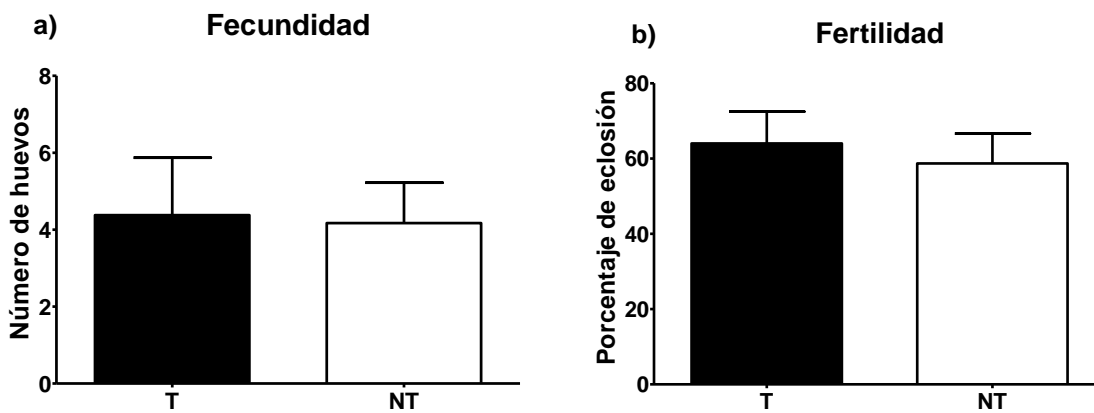


Figura 5.11. Resultados del experimento 3. a) Promedio diario del número de huevos depositados por hembra (fecundidad); **b)** Porcentaje de eclosión promedio (fertilidad). Referencias. T: hembras tratadas con metopreno; NT: hembras no tratadas. Las barras representan el error estándar de la media.

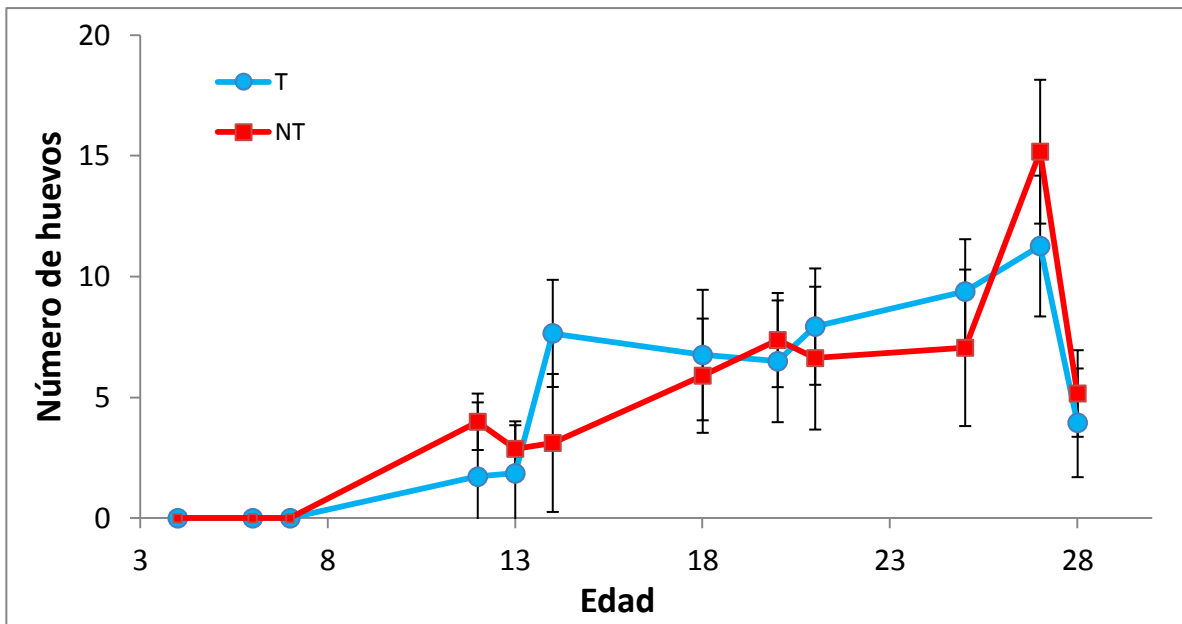


Figura 5.12. Patrón temporal de oviposición correspondiente al experimento 3. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el promedio diario del número de huevos depositados por hembra. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. Referencias: T: hembras tratadas con metopreno; NT: hembras no tratadas.

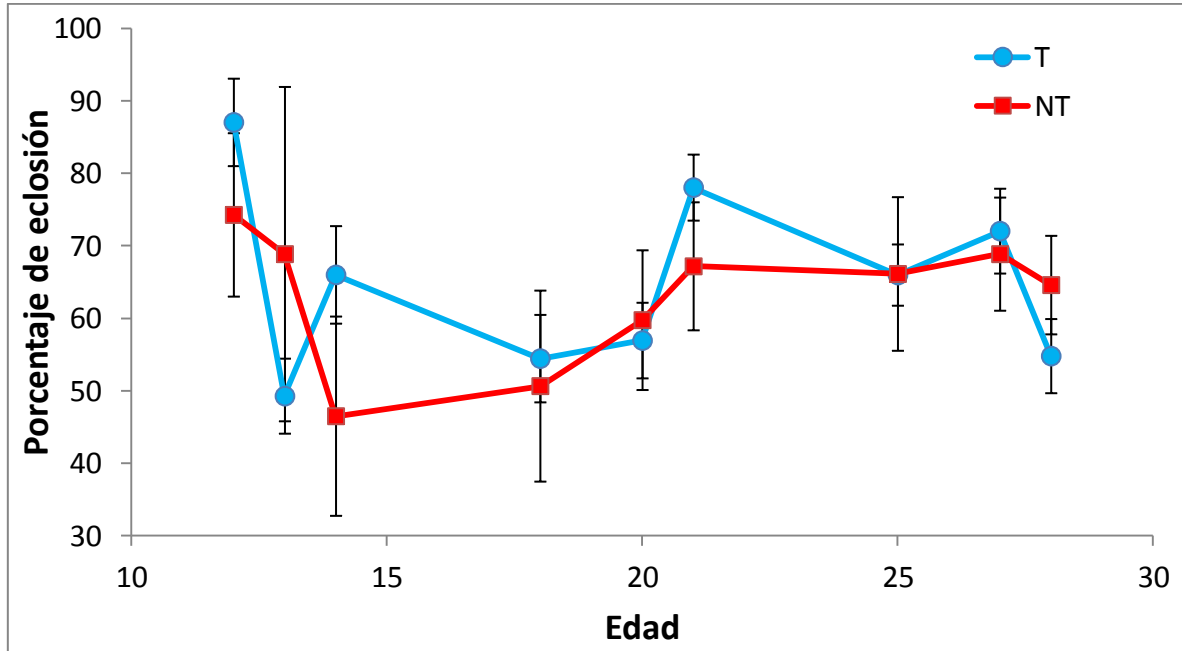


Figura 5.13. Patrón temporal de eclosión de huevos correspondiente al experimento 3. El eje horizontal indica la edad de las hembras. El eje vertical indica el porcentaje promedio de huevos eclosionados. Las barras de cada punto representan el error estándar de la media. El porcentaje de eclosión se pudo realizar sólo a partir de los 12 días de edad debido a que los primeros tres días de registro no se observaron huevos para ninguno de los dos tipos de hembras (ver Figura 5.12). Referencias: T: hembras tratadas con metopreno; NT: hembras no tratadas.

5.4. Discusión

En los Capítulos 2 y 4 se describió que las hembras de *A. fraterculus* prefieren aparearse con machos sometidos a la exposición a compuestos volátiles de guayaba y al tratamiento con metopreno, respectivamente. Como se mencionó en la introducción, los beneficios que las hembras podrían obtener por aparearse preferencialmente con los machos tratados podrían ser de tipo directo o indirecto. Este capítulo evaluó la existencia de un beneficio directo en términos de fecundidad y/o fertilidad. En los experimentos en que el tratamiento de los machos correspondió a la exposición a volátiles de guayaba se evidenció un beneficio directo para las hembras. Por su parte, en el experimento que involucró tratamiento de machos con metopreno no se encontraron evidencias de beneficios directos para las hembras. Esto podría indicar que la preferencia por mejores machos no siempre posee asociado un beneficio directo sobre las hembras, siendo posible que la elección responda a la adquisición de beneficios indirectos (heredando mejor calidad genética a su descendencia).

Las hembras que eligieron aparearse con machos expuestos a guayaba presentaron mayor fecundidad y no vieron afectada la fertilidad. El patrón temporal de oviposición mostró que las hembras apareadas con machos expuestos depositan más huevos que las apareadas con machos no tratados incluso a edades superiores a los 40 días, lo cual puede indicar que el beneficio por aparearse con machos expuestos estaría relacionado con la fecundidad a largo plazo y no solamente al comienzo del período de oviposición. Por otro lado, el patrón de eclosión de huevos fue relativamente constante para ambos tipos de hembras. Durante los primeros tres días de registro (correspondientes a las edades de 12, 13 y 15 días) el número de huevos depositados por hembras apareadas con machos expuestos fue muy bajo y durante los dos primeros días fue cero para hembras apareadas con machos no expuestos. Esto imposibilitó el registro de eclosión para esos días, y para los días en que hubo pocos huevos provocó que los valores calculados presentaran variaciones muy marcadas.

Lo encontrado en el experimento 1 concuerda con lo obtenido por Kumaran *et al.* (2013a) para *B. tryoni* quienes registraron mayor fecundidad en hembras apareadas con machos expuestos a un agente potenciador del éxito de apareamiento en esa especie (cuelure o zingerone). Este es el único antecedente para moscas tefritidas en el cual, al igual que en este capítulo, se encontraron evidencias de un beneficio directo asociado a la fecundidad para las hembras. En esta familia de moscas, existen otros estudios dirigidos a dilucidar la existencia de beneficios directos para las hembras por elegir aparearse con machos que fueron tratados con compuestos potenciadores (Shelly 2000b, 2005, Shelly y Nishida 2004, Kumaran 2013b).

Sin embargo, a diferencia de lo hallado en el presente capítulo y en el trabajo de Kumaran *et al.* (2013a), en esos otros estudios no se encontraron evidencias de beneficios directos para las hembras. Por ejemplo, las hembras de *B. dorsalis* que eligieron el apareamiento con machos alimentados con metil eugenol no vieron incrementada su fecundidad, fertilidad ni supervivencia a pesar de haber elegido activamente a estos machos para el apareamiento (Shelly 2000a, Shelly y Nishida 2004). Del mismo modo, las hembras de *C. capitata* que seleccionaron preferencialmente a machos expuestos al ARJ no presentaron alterados estos parámetros (Shelly 2005). Los motivos por los cuales las hembras de *A. fraterculus* y *B. tryoni* apareadas con los machos sexualmente más competitivos experimentan una fecundidad aumentada se desconocen y representan un interesante campo de investigación a futuro.

El apareamiento con machos tratados con metopreno no resultó en un mayor número de huevos ni un mayor porcentaje de eclosión. Esto indica que no existió un beneficio directo para las hembras, por lo menos en cuanto a los parámetros estudiados. Esto contrasta con lo encontrado para las hembras apareadas con machos expuestos a guayaba y concuerda con la falta de evidencia de beneficios directos hallado en casi todos los antecedentes de este tipo en Tephritidae (Shelly 2000a, 2005; Shelly y Nishida 2004, Kumaran *et al.* 2013b). No obstante, la fuerte preferencia de las hembras por machos tratados con metopreno (hallada en todos los experimentos realizados) sugiere que aún debería existir algún beneficio para las hembras, tal vez indirecto. En el Capítulo 4 se encontró que los machos tratados con metopreno liberan mayor cantidad de feromona que los machos no tratados y que las hembras también los eligieron para el apareamiento. Segura *et al.* (2007) encontraron que las hembras de *A. fraterculus* eligen a los machos que invierten más tiempo en actividades de llamado sexual, como la liberación de feromona. Podría pensarse, entonces, que el tratamiento con metopreno estimula a los machos a realizar un llamado sexual más intenso y que esto es percibido por las hembras, quienes obtendrían un beneficio de tipo indirecto al aparearse con estos machos, ya sea bajo el mecanismo del “hijo atractivo” o de “buenos genes”. Alternativamente, Kumaran *et al.* (2013a) postulan que el apareamiento diferencial puede no ser debido a una verdadera preferencia por parte de las hembras, sino a una mayor habilidad de los machos de lograr apareamientos. La mayor capacidad de los machos por conseguir cópulas podría explicarse a través de mayor agresividad ante otros machos competidores o a través mayor sometimiento de las hembras por parte de los machos. De cualquier forma, esto también contemplaría beneficios para las hembras, ya que los mejores machos son los que posiblemente engendren hijos con altas chances de acceder a las hembras; hecho no menor en

un sistema de apareamiento de tipo lek como el que presenta *A. fraterculus*. Para poder ahondar en las bases de esta preferencia, se necesitan nuevos experimentos.

Guillot (2003) describió para *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) el camino que seguirán los oocitos en desarrollo depende de la interacción entre la hormona juvenil y sustancias transmitidas por el macho durante la cópula. Además, la inyección de estos productos en hembras vírgenes estimula el desarrollo de los oocitos y este efecto puede ser mimetizado por el topicado sobre estas hembras con metopreno (Soller *et al.* 1997, 1999). Esto sugiere que en *D. melanogaster* el topicado de las hembras con metopreno podría provocar mayores tasas de oviposición. Para *A. fraterculus* esto no pareciera ser así, ya que en el experimento 3, en el cual el tratamiento con metopreno se realizó directamente sobre las hembras no se registró un aumento de la fecundidad ni de fertilidad en hembras tratadas, y el patrón temporal de oviposición y eclosión de huevos fue similar entre los dos tipos de hembras. Esta falta de efecto sobre aspectos relacionado con la fecundidad y la maduración en hembras resultó ser acorde a estudios previos con especies del género *Anastrepha* y *Bactrocera* en los que se registró maduración acelerada en machos pero la maduración en hembras resultó inalterada (Teal *et al.* 2000, Smallridge *et al.* 2006), aunque un estudio en *A. ludens* mostró una leve maduración prematura en hembras (Pereira *et al.* 2011). En su conjunto, estos resultados descartan la hipótesis planteada acerca de la mayor fecundidad y fertilidad en hembras tratadas con metopreno. La hipótesis estaba basada en la idea de que la transferencia de sustancias del macho a la hembra durante la cópula ayuden a la hembra en el desarrollo de los huevos adjudicándole mayores tasas de oviposición o mayores probabilidades de supervivencia de sus embriones. No obstante, los resultados no apoyan esta idea, puesto que de ser así, se esperaba que las hembras que recibieron el tratamiento con metopreno exhiban algún incremento en estos parámetros, que quizás no fue advertido en el experimento 2 por limitaciones experimentales.

Tanto para los experimentos de machos tratados con metopreno como para los de machos expuestos a guayaba, todavía pueden existir beneficios directos que aquí no fueron estudiados. Por ejemplo, el riesgo de predación sobre la hembra podría verse reducido si esta se apareara con un macho que transfiera productos químicos durante la cópula que modulen la receptividad de la hembra postergando la necesidad de un nuevo apareamiento, debido a que la exposición de la hembra durante la cópula es el principal facilitador de predación por enemigos naturales (Yuval *et al.* 2002, Gavriel *et al.* 2009, 2010, Morelli *et al.* 2013). Como fue propuesto por Shelly (2005), también podría existir un beneficio directo asociado a una mayor facilidad para encontrar al macho. Si un macho realiza un llamado sexual más intenso y

llamativo, las hembras podrán ubicarlo más rápidamente y así gastar menos tiempo y recursos energéticos. Los resultados obtenidos en la presente tesis se encuadraran dentro de esta idea, ya que se encontró evidencia de que los machos expuestos a guayaba o tratados con metopreno realizan el comportamiento de atracción de hembras (llamado sexual y liberación de feromona), lo cual podría indicar que los beneficios por la elección de estos machos puede relacionarse con preservar tiempo y energía.

Si bien los beneficios asociados a aparearse con machos sexualmente ventajosos han sido estudiados para algunas especies de Tephritidae (Blay y Yuval 1999, Yuval *et al.* 2002, Pérez-Staples *et al.* 2004, Gavriel *et al.* 2009, 2010, Morelli *et al.* 2013, Kumaran 2013, 2014), se desconocen los mecanismos fisiológicos que permiten este incremento en la fecundidad. Sobre la base de lo descrito en otros sistemas, se podrían postular dos mecanismos posibles. Uno de estos mecanismos se relaciona con lo planteado en el Capítulo 4 acerca de la transferencia de machos a hembras, durante la cópula, de compuestos que estimulan la oviposición y/o aceleran la maduración de ovocitos, como la hormona juvenil u otros compuestos que estimulan la producción endógena de esta hormona en las hembras (Park *et al.* 1998, Shu *et al.* 1998, Pszczolkowski *et al.* 2006, Clifton *et al.* 2014). Para esto, en el caso de la exposición a guayaba los volátiles del fruto deberían alterar la fisiología reproductiva de los machos, de forma tal que se produzcan mayores cantidades de estos compuestos que se transferirán a las hembras. El aroma de la mezcla de volátiles de guayaba debería estimular los órganos sensoriales de los machos provocando respuestas neuronales que desencadenen la síntesis de tales compuestos. Aún cuando existen evidencias de la transferencia de hormona juvenil durante la cópula para el mosquito *A. aegypti* (Clifton *et al.* 2014), si este mecanismo se disparase frente a exposición a guayaba se esperaría una respuesta similar (o incluso más evidente) cuando los machos son tratados directamente con análogos de la hormona juvenil, y ese no fue el escenario encontrado en este capítulo. El segundo mecanismo corresponde a la absorción de compuestos volátiles provenientes de la fruta a través de la cutícula de los machos. Si bien es una explicación un tanto especulativa, Hughes (1974) y Byers (1982) observaron que algunas especies de escarabajos del género *Ips* (De Geer) (Coleoptera: Curculionidae) son capaces de absorber, a través de la cutícula, compuestos volátiles de sus plantas hospederas y utilizarlos como precursores de feromonas. A su vez, Yasui *et al.* (2007, 2008) demostraron que las hembras de un escarabajo cerambícido pueden absorber compuestos volátiles desde el aire, incrementando la atracción de machos. Esto demuestra que ciertos volátiles pueden ser “recolectados” por los insectos directamente desde el aire y pueden influir en las interacciones sexuales. Si esto ocurriese en *A. fraterculus*, los compuestos

absorbidos podrían ser posteriormente transferidos a las hembras durante la cópula (ya sea como compuesto inalterado o como sus metabolitos) estimulando la producción de huevos y la oviposición (Shelly 2005).

Un aspecto que hay que tener presente es que las hembras siempre se alimentaron *ad-libitum* con dietas completas y con altos contenidos proteicos. Esta dieta sería quizás difícil de alcanzar en un entorno natural. Estudios realizados con *A. ludens* y *A. obliqua* demostraron que las hembras producen más huevos cuando se les suministra una buena fuente proteica además de azúcar (Aluja *et al.* 2001a, Teal *et al.* 2011). A su vez, Pszczolkowski *et al.* (2006), se refirió a que las hembras con las necesidades energéticas y nutricionales totalmente cubiertas deberían alcanzar tasas de oviposiciones máximas. Por lo tanto, aún cuando los machos puedan estar transfiriendo compuestos que ayuden al desarrollo de oocitos, estos compuestos serían de escasa necesidad en hembras con altos niveles nutricionales y, por consiguiente, hembras de ambos tratamientos no presentarían diferencias en la fecundidad. Esto significa, que el diseño utilizado en el presente trabajo podría subestimar el impacto de aparearse con los machos más exitosos, impidiendo quizás que en el caso del tratamiento con metopreno se evidencien beneficios directos si estos fueran sutiles. En este sentido, en experimentos futuros se debería considerar hembras que no se encuentren en su óptimo estado nutricional, de manera que el eventual beneficio por aparearse con machos de buena calidad sea más evidente. Esto debería ser tenido en cuenta también en experimentos similares al experimento 3 donde se evaluó la aplicación de metopreno directamente en las hembras.

La preferencia de las hembras por machos tratados con agentes potenciadores del éxito de apareamiento asociado a una mayor fecundidad tiene consecuencias positivas en el marco de la TIE. En las crías masivas, mayores tasas de fecundidad representarían menor cantidad de adultos en jaulas, menos espacio ocupado y menos alimento necesario. Todo esto traería apareado crías con mayor rendimiento e inferiores costos de mantenimiento. Asimismo, si los machos estériles expuestos a guayaba son capaces de inducir mayor fecundidad en las hembras silvestres, entonces una mayor proporción de su progenie debería ser estéril, algo beneficioso en aquellos casos en que las hembras se aparean con varios machos y existe mezcla de esperma fértil y estéril. No obstante, cabe destacar que toda la información acerca del efecto de la exposición a guayaba fue obtenida utilizando machos fértiles y bajo condiciones de laboratorio, dos aspectos que deben considerarse en futuros ensayos dirigidos a estimar la efectividad de este tratamiento en el control de *A. fraterculus* mediante la TIE. Resulta interesante notar que la fertilidad fue levemente mayor en hembras apareadas con machos no tratados con metopreno en varios de los días en que se evaluó el

porcentaje de eclosión. Si bien estas diferencias no fueron significativas, podrían reflejar algún problema de maduración en los machos tratados con metopreno, y esto podría tener consecuencias a nivel de la efectividad de la TIE; otro aspecto que debería ser considerado a futuro.

En vistas de lo expuesto, en este capítulo fue posible encontrar, al menos para la exposición a guayaba, una explicación a la preferencia observada en relación a una mayor fecundidad. Para el caso de metopreno, si bien no se encontraron beneficios asociados a la fecundidad o fertilidad, no se pueden descartar los beneficios indirectos que podrían estar involucrados. En este sentido, se puede proponer que *A. fraterculus* podría presentar un comportamiento similar al observado para *B. tryoni*. Los alcances de los resultados obtenidos amplían los conocimientos sobre los mecanismos involucrados en la elección de pareja en *A. fraterculus* y sus implicancias evolutivas.

5.5. Referencias

- Abraham S, Cladera J, Goane L y Vera MT.** 2011. Factors affecting *Anastrepha fraterculus* female receptivity modulation by accessory gland products. *Journal of Insect Physiology*. 58(1): 1-6.
- Abraham S, Liendo MC, Devescovi F, Peralta PA, Yusef V, Ruiz J, et al.** 2013. Remating behavior in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females is affected by male juvenile hormone analog treatment but not by male sterilization. *Bulletin of Entomological Research*. 103(3): 310-317.
- Aluja M, Díaz-Fleischer F, Papaj DR, Lagunes G y Sivinski J.** 2001a. Effects of age, diet, female density and host resource on egg load in *Anastrepha leudens* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology*. 47: 975-988.
- Aluja M, Pérez-Staples D, Sivinski J, Sánchez A y Pinero J.** 2008. Effects of male condition on fitness in two tropical tephritid flies with contrasting life histories. *Animal Behaviour*. 76(6): 1997-2009.
- Andersson MB.** 1994. Sexual selection. Princeton University Press.
- Arnqvist G y Nilsson T.** 2000. The evolution of polyandry: Multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*. 60: 145-164.
- Basolo AL.** 1990. Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fishes. *Science*. 250: 808-810.
- 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. *Annals of the Entomological Society of America*. 92(2): 278-284.
- Byers JA.** 1982. Male-specific conversion of the host plant compound, myrcene, to the pheromone, (+)-ipsdienol, in the bark beetle, *Dendroctonus brevicornis*. *Journal of Chemical Ecology*. 8: 363-371.
- Christy JH y Backwell P.** 1995. The sensory exploitation hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*. 10: 417-417.
- Clifton, ME, Correa S, Rivera-Perez C, Nouzova M, y Noriega FG.** 2014. Male *Aedes aegypti* mosquitoes use JH III transferred during copulation to influence previtellogenic ovary physiology and affect the reproductive output of female mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 64: 40-47.
- Clutton-Brock TH y Parker GA.** 1992. Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. *Quarterly Review of Biology*. 67: 437-456.
- Clutton-Brock TH y Vincent AC.** 1991. Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature*. 351(6321): 58-60.

- Contreras-Garduño J, Córdoba-Aguilar A, Peretti A y Drummond H.** 2009. En: *Evolución Biológica: Selección sexual*. Eds. Morrone JJ, Magaña P. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 193-236.
- Darwin C.** 1871. La descendencia del hombre y la selección en relación al sexo.
- De Lima IS, Howse PE y Salles LAB.** 1994. Reproductive behavior of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field studies. *Physiological Entomology*. 19: 271-277.
- Endler JA.** 1992. Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *American Naturalist Special*. 139: 125–153.
- Fedorka KM y Mousseau TA.** 2002. Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry. *Animal Behaviour*. 64: 361-367.
- Fisher RA.** 1930. The genetical theory of natural selection. Oxford University Press.
- Flores S, Rivera JP, Hernandez E y Montoya P.** 2011. The Effect of Ginger Oil on the Sexual Performance of *Anastrepha* Males (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 94(4): 916-922.
- García CM y Ramírez E.** 2005. Evidence that sensory traps can evolve into honest signals. *Nature*. 434(7032): 501-505.
- Gavriel S, Gazit Y y Yuval B.** 2009. Remating by female Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*, Diptera: Tephritidae): temporal patterns and modulation by male condition. *Journal of Insect Physiology*. 55(7): 637-642.
- Gavriel S, Jurkevitch E, Gazit Y y Yuval B.** 2010. Bacterially enriched diet improves sexual performance of sterile male Mediterranean fruit flies. *Journal of Applied Entomology*. 135(7): 564-573.
- Gillott C.** 2003. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual Review of Entomology*. 48(1): 163-184.
- González A, Rossini C, Eisner M y Eisner T.** 1999. Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(10): 5570-5574.
- Gwynne DT.** 1984. Courtship feeding increases female reproductive success in bushcrickets. *Nature*. 307: 361-63.
- Harré R.** 1991. Diccionario de etología y aprendizaje animal. *Paidós*. ISBN 84-7509-714-6.
- Hughes PR.** 1974. Myrcene: a precursor of pheromones in Ips beetles. *Journal of Insect Physiology*. 1271-1275.
- Iwasa Y y Pomiankowski A.** 1995. Continual change in mate preferences. *Nature*. 377(6548): 420-422.
- Iyengar VK y Eisner T.** 1999a. Heritability of body mass, a sexually selected trait, in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 9169–9171.
- Iyengar VK y Eisner T.** 1999b. Female choice increases offspring fitness in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 15013–15016.
- Jaldo HE, Gramajo C y Willink E.** 2001. Mass rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): a preliminary strategy. *Florida Entomologist*. 84: 716–718.
- Ji QE, Chen JH, McInnis DO y Guo QL.** 2013. The effect of methyl eugenol exposure on subsequent mating performance of sterile males of *Bactrocera dorsalis*. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 238-243.
- Johnstone RA.** 1995. Sexual selection, honest advertisement and the handicap principle – reviewing the evidence. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 70: 1–65.
- Jones TM, Quinnell RJ y Balmford A.** 1998. Fisherian flies: benefits of female choice in a lekking sandfly. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 265: 1651–1657.
- Kouloussis NA, Katsoyannos BI, Papadopoulos NT, Ioannou CS y Iliadis IV.** 2013. Enhanced mating competitiveness of *Ceratitis capitata* males following exposure to citrus compounds. *Journal of Applied Entomology*. 137 (1): 30–38.
- Kumaran N, Balagawi S, Schutze MK y Clarke AR.** 2013. Evolution of lure response in tephritid fruit flies: phytochemicals as drivers of sexual selection. *Animal Behaviour*. 85: 781–789.
- Kumaran N y Clarke AR.** 2014. Indirect effects of phytochemicals on offspring performance of Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 138(5): 361-367.
- Landolt PJ, Reed HC y Heath RR.** 1992. Attraction of female papaya fruit-fly (Diptera, Tephritidae) to male pheromone and host fruit. *Environmental Entomology*. 21: 1154–1159.

- Landolt PJ y Phillip TW.** 1997. Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*. 42: 371–91. PMID: 15012318
- Morató S, Shelly T, Rull J y Aluja M.** 2015. Sexual competitiveness of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) males exposed to Citrus aurantium and Citrus paradisi essential oils. *Journal of Economic Entomology*. tou054.
- Morelli R, Paranhos BJ, Coelho AM, Castro R, Garziera L, Lopes F y Bento JMS.** 2013. Exposure of sterile Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) males to ginger root oil reduces female remating. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 75-82.
- Orankanok W, Chinvinijkul S, Sawatwangkhong A, Pinkaew S y Orankanok S.** 2013. Methyl eugenol and pre-release diet improve mating performance of young *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera correcta* males. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 200-209.
- Papadopoulos NT, Shelly TE, Niyazi N y Jang E.** 2006. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior*. 19: 403–418.
- Park YI, Shu S, Ramaswamy SB y Srinivasan A.** 1998. Mating in *Heliothis virescens*: transfer of juvenile hormone during copulation by male to female and stimulation of biosynthesis of endogenous juvenile hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 38(2): 100-107.
- Pereira R, Sivinski J y Teal PE.** 2011. Influence of a juvenile hormone analog and dietary protein on male *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) sexual success. *Journal of economic Entomology*. 103(1): 40-46.
- Perez-Staples D y Aluja M.** 2004. *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) females that mate with virgin males live longer. *Annals of the Entomological Society of America*. 97(6): 1336-1341.
- Pszczolkowski MA, Tucker A, Srinivasan A y Ramaswamy SB.** 2006. On the functional significance of juvenile hormone in the accessory sex glands of male *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology*. 52(8): 786-794.
- Reinhold K.** 1999. Paternal investment in *Poecilimon veluchianus* bushcrickets: beneficial effects of nuptial feeding on offspring viability. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 45: 293-299.
- Robert T.** 1972. Parental investment and sexual selection. *Sexual Selection & the Descent of Man*. Aldine de Gruyter, New York. 136-179.
- Rodd FH, Hughes KA, Grether GF y Baril CT.** 2002. A possible non-sexual origin of mate preference: are male guppies mimicking fruit?. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 269(1490): 475-481.
- Ryan MJ.** 1990. Sensory systems, sexual selection, and sensory exploitation. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. 7: 157-195.
- Ryan MJ.** 1997. Sexual selection and mate choice. En: *Behavioural ecology*, 4th edn ed. J. R. Krebs y N. B. Davies. pp. 179–202. Oxford: Blackwell Science.
- Ryan MJ.** 1998. Sexual selection, receiver biases, and the evolution of sex differences. *Science*. 281: 1999–2003.
- Segura DF, Petit-Marty N, Sciarano RB, Vera MT, Calcagno G, Allinghi A, et al.** 2007. Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 90: 154–162.
- Segura DF, Cáceres C, Vera MT, Wornoayporn V, Islam A, Teal PEA, et al.** 2009. Enhancing mating performance after juvenile hormone treatment in *Anastrepha fraterculus*: a differential response in males and females acts as a physiological sexing system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 131(1): 75–84.
- Shelly TE y Dewire AM.** 1994. Chemically mediated success in male Oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 375–382.
- Shelly TE.** 2000a. Effects of raspberry ketone on the mating success of male melon flies (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*. 34: 143-147.
- Shelly TE.** 2000b. Fecundity of female oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae): effects of methyl eugenol-fed and multiple mates. *Annals of the Entomological Society of America*. 93(3): 559-564.
- Shelly TE.** 2001. Exposure to alpha-copaene and alpha-copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 94: 497–502.
- Shelly TE y McInnis DO.** 2001. Exposure to ginger root oil enhances mating success of irradiated, mass-reared males of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of economic Entomology*. 94(6): 1413-1418.

- Shelly TE, Rendon P, Hernandez E, Salgado S, McInnis D, Villalobos E y Liedo P.** 2003. Effects of diet, ginger root oil, and elevation on the mating competitiveness of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from a mass-reared, genetic sexing strain in Guatemala. *Journal of economic Entomology*. 96(4): 1132-1141.
- Shelly TE y Nishida R.** 2004. Larval and adult feeding on methyl eugenol and the mating success of male oriental fruit flies, *Bactrocera dorsalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 112(2): 155-158.
- Shelly T, Dang C y Kennelly S.** 2004. Exposure to orange (*Citrus sinensis* L.) trees, fruit, and oil enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata* [Wiedemann]). *Journal of insect behavior*. 17(3): 303-315.
- Shelly TE.** 2005. Does mating with ginger root oil-exposed males confer fitness benefits to female Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)? *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*. 37: 65-71.
- Shelly TE, Cowan AN, Edu J y Pahio E.** 2007b. Mating success of male Mediterranean fruit flies following exposure to two sources of α -copaene, manuka oil and mango. *Florida Entomologist*. 91: 9-15.
- Shelly TE, War M y Favela A.** 2008a. Exposing entire adult holding rooms containing sterile male Mediterranean fruit flies to orange oil increases the mating success of those males in field-cage trials. *Florida entomologist*. 91(4): 686-689.
- Shelly TE y Epsky ND.** 2015. Exposure to tea tree oil enhances the mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 98(4): 1127-1133.
- Shu S, Park YI, Ramaswamy SB y Srinivasan A.** 1998. Temporal profiles of juvenile hormone titers and egg production in virgin and mated females of *Heliothis virescens* (Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*. 44: 1111-1117.
- Sivinski JM.** 1993. Longevity and fecundity in the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae): effects of mating, strain and body size. *Florida Entomologist*. 76(4): 635-644.
- Smallridge CJ, Cockington VG, Taylor P, Jessup A y McInnis D.** 2006. Investigations into improving the competitiveness of sterile Queensland Fruit Fly, *Bactrocera tryoni*. En: *Proceedings, 2nd Research Coordination Meeting on Improving Sterile Male Performance in Fruit Fly SIT Programmes*. ed. International Atomic Energy Agency. p. 79. IAEA, Vienna, Austria.
- Soller M, Bownes M y Kubli E.** 1997. Mating and sex peptide stimulate the accumulation of yolk in oocytes of *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Biochemistry*. 243(3): 732-738.
- Soller M, Bownes M y Kubli E.** 1999. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Developmental biology*. 208(2): 337-351.
- Tan KH y Nishida R.** 1996. Sex pheromone and mating competition after methyl eugenol consumption in the *Bactrocera dorsalis* complex. En: *Fruit fly pests—a world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray, FL USA. 147-153.
- Teal PEA, Gomez-Simuta Y y Proveaux AT.** 2000. Mating experience and juvenile hormone enhance sexual signaling and mating in male Caribbean fruit flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(7): 3708-3712.
- Teal PEA, Pereira R, Segura DF, Haqi, Gómez-Simuta Y, Robinson AS y Hendrichs J.** 2011. Methoprene and protein supplements accelerate reproductive development and improve mating success of male tephritid flies. *Journal of Applied Entomology*. 1439-0418.
- Trivers R.** 1972. Parental investment and sexual selection. En: *Sexual selection and the descent of man*. Ed. Campbell B. Biological Laboratories, Harvard University. 136: 179.
- Vera MT, Abraham S, Oviedo A y Willink E.** 2007. Demographic and quality control parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) artificial rearing. *Florida Entomologist*. 90: 53-57.
- Vera MT, Ruiz MJ, Oviedo A, Abraham S, Mendoza M, Segura DF, et al.** 2013. Fruit compounds affect male sexual competitiveness in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 2-10.
- Wee SL y Tan KH.** 2007. Temporal accumulation of phenylpropanoids in male fruit flies, *Bactrocera dorsalis* and *B. carambolae* (Diptera: Tephritidae) following methyl eugenol consumption. *Chemoecology*. 17(2): 81-85.
- West-Eberhard MJ.** 1984. Sexual selection, competitive communication and species-specific signals in insects. En: *Insect communication Academic*. ed. T. Lewis. pp.283-324. New York.
- Wyatt TD.** 2003. Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste. Cambridge University Press.

- Yasui H, Yasuda T, Fukaya M, Akino T, Wakamura S, Hirai Y, et al.** 2007. Host plant chemicals serve intraspecific communication in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied entomology and zoology*. 42(2): 255-268.
- Yasui H, Akino T, Fukaya M, Wakamura S y Ono H.** 2008. Sesquiterpene hydrocarbons: kairomones with a releaser effect in the sexual communication of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae). *Chemoecology*. 18(4): 233-242.
- Yuval B, Kaspi R, Field SA, Blay S y Taylor P.** 2002. Effects of post-teneral nutrition on reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*. 85(1): 165-170.
- Zahavi A.** 1975. Mate selection—a selection for a handicap. *Journal of theoretical Biology*. 53(1): 205-214.
- Zahavi A.** 1977. The cost of honesty: further remarks on the handicap principle. *Journal of theoretical Biology*. 67(3): 603-605.
- Zar J.** 1996. Biostatistical Analysis. Upper Saddle River, NJ, USA, Prentice-Hall.

Capítulo 6

Conclusiones finales

Conclusiones finales

En la presente tesis se exploraron algunos factores que afectan el comportamiento sexual de los machos de *Anastrepha fraterculus* y se estudiaron los mecanismos asociados. En particular se investigó si el tratamiento con volátiles de frutos de guayaba o con un análogo de la hormona juvenil de los insectos (metopreno) provoca un aumento del éxito copulatorio en los machos, tal que estos sean aceptados preferencialmente por parte de las hembras. Ya que los mecanismos asociados a este fenómeno de selección sexual pueden estar ligados a la comunicación química, visual y acústica entre sexos, se analizaron los perfiles químicos y comportamentales de los machos tratados con estos compuestos. Por último, mediante la estimación de variables de fecundidad y fertilidad se evaluó el valor reproductivo asociado a este proceso de selección. Las principales conclusiones que se extraen de esta tesis se enumeran a continuación:

I- La exposición de machos de *A. fraterculus* a los volátiles del fruto de guayaba aumenta su éxito copulatorio, tanto en insectos de laboratorio como silvestres. Este efecto está asociado a una mayor tasa de despliegues sexuales y liberación de feromona; y no parece estar mediado por cambios cualitativos en los componentes feromonales o en compuestos retenidos en la cutícula de los machos expuestos.

II- El efecto de la exposición a guayaba pudo ser parcialmente replicado por la exposición a un subconjunto de compuestos identificados en el aroma de los frutos. Esto abre la puerta a mayor investigación para desarrollar un tratamiento que se pueda aplicar a escala masiva como parte de la estrategia de control conocida como la Técnica del Insecto Estéril.

III- El tratamiento de los machos con metopreno permite a estos aumentar su éxito copulatorio aún después de alcanzada la edad de maduración sexual natural de la especie. Este efecto perdura en el tiempo al menos hasta los 20 días post-emergencia.

IV- El aumento del éxito copulatorio por el tratamiento con metopreno no estaría mediado por un efecto de perfumado, sino más bien por un marcado aumento en la tasa de liberación de feromona sexual, levemente acompañado por una mayor tasa de despliegues sexuales. Estos cambios fisiológicos, son percibidos (y preferidos) por hembras que han madurado recientemente como por hembras ya maduras de edad avanzada.

V- Los beneficios que las hembras obtienen al aparearse con los machos preferidos parecen ser de tipo directo en el caso de exposición a guayaba.

VI- En el caso del tratamiento con metopreno, los beneficios que las hembras obtienen al aparearse con los machos tratados no parecen ser de tipo directo al menos en lo que se relaciona a mayor fecundidad o fertilidad. En este caso se presume que los beneficios serían del tipo indirecto.

Anastrepha fraterculus es una importante plaga de los frutales en Sudamérica y el único método de control disponible es el uso de pesticidas. Una alternativa amigable con el ambiente para controlar esta plaga es la TIE. La cría masiva continuada y la esterilización pueden comprometer, entre otras cosas, la capacidad de los machos para realizar cortejos elaborados resultando en una baja competitividad sexual (McInnis *et al.* 1996, Cayol 2000, Lux *et al.* 2002, Rull *et al.* 2005). Estas limitaciones relacionadas con la competitividad de apareamiento de las moscas criadas masivamente y luego esterilizadas, pueden (al menos parcialmente) ser superadas mediante el suministro de suplementos dietarios, dosis de radiación apropiadas, buenas condiciones de irradiación y tratamientos previos a la liberación (Allinghi *et al.* 2007, Segura *et al.* 2009, 2013, Liendo *et al.* 2013). La exposición a volátiles de frutos antes de la liberación y/o el tratamiento con metopreno podría mejorar la efectividad de los machos estériles de la misma forma que actualmente se utiliza para *C. capitata* (Shelly 2001, Shelly *et al.* 2007).

Para *A. fraterculus*, este trabajo de tesis constituye un gran avance para entender los mecanismos involucrados en el efecto de la exposición a volátiles de plantas, así como las implicancias fisiológicas que puedan haber marcado el camino evolutivo para que se fije una dada preferencia por parte de la hembra. Asimismo, abre una serie de interrogantes que permitirán avanzar en esta línea de investigación. Cabe mencionar que los resultados obtenidos en esta tesis están basados en ensayos íntegramente de laboratorio, no existiendo experimentos que incluyan la competencia entre machos silvestres y machos de cría masiva ni mejoramiento sexual de machos estériles. Estos experimentos constituyen una siguiente etapa debido a que con ellos se obtendrán resultados decisivos con el objeto de fomentar su implementación.

Referencias

- McInnis DO, Lance DR y Jackson CG.** 1996. Behavioral resistance to the sterile insect technique by mediterranean fruit fly (diptera: tephritidae) in Hawaii. *Annals of the Entomological Society of America*. 89: 739–744.
- Cayol JP.** 2000. Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by mass-rearing processes. En: Aluja M, Norrbom AL, editors. Fruit flies (Tephritidae): *phylogeny and evolution of behavior*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 843–860.
- Lux SA, Vilardi JC, Liedo P, Gaggi K, Calcagno GE, Munyiri FN, et al.** 2002. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomologist*. 85: 102–112.
- Rull J, Brunel O y Méndez ME.** 2005. Mass rearing history negatively affects mating success of male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) reared for sterile insect technique programs. *Journal of Economic Entomology*. 98: 1510–1516. PMID: 16334318
- Allinghi A, Calcagno G, Petit-Marty N, Gómez Cendra P, Segura D, Vera T, et al.** 2007. Compatibility and competitiveness of a laboratory strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after irradiation treatment. *Florida Entomologist*. 90(1): 27–32.
- Segura DF, Cáceres C, Vera MT, Wornoyaporn V, Islam A, Teal PEA, et al.** 2009. Enhancing mating performance after juvenile hormone treatment in *Anastrepha fraterculus*: a differential response in males and females acts as a physiological sexing system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 131(1): 75–84.
- Segura DF, Utgés ME, Liendo MC, Rodríguez MC, Devescovi F, Vera M, et al.** 2013. Methoprene treatment reduces the pre-copulatory period in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males. *Journal of Applied Entomology*. 137(1): 19–29.
- Liendo MC, Devescovi F, Bachmann GE, Utgés ME, Abraham S, Vera MT, et al.** 2013. Precocious sexual signalling and mating in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males achieved through juvenile hormone treatment and protein supplements. *Bulletin of Entomological Research*. 103(1): 1-13.
- Shelly TE.** 2001. Exposure to alpha-copaene and alpha-copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 94: 497–502.
- Shelly T, Edu J, Smith E, Hoffman K, War M, Santos R, et al.** 2007. Aromatherapy on a large scale: exposing entire adult holding rooms to ginger root oil increases the mating competitiveness of sterile males of the Mediterranean fruit fly in field cage trials. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 123(2): 193-201.