



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Bases químicas y fisiológicas de la estimulación sexual de machos
de *Anastrepha fraterculus* tras la exposición a volátiles de guayaba**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Lic. Silvina Anahí Belliard

Director de tesis: Dr. Diego F. Segura

Directora Adjunta: Dra. Patricia C. Fernández

Consejero de Estudios: Dr. Pablo E. Schilman

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insectos de Importancia Agronómica. Instituto de Genética
“Ing. Agr. Ewald A. Favret”, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IGEA-INTA),
Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 2023

Bases químicas y fisiológicas de la estimulación sexual de machos de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) tras la exposición a volátiles de guayaba

Anastrepha fraterculus, es una de las principales plagas de especies frutícolas de Sudamérica. En esta especie se ha encontrado que los machos que estuvieron expuestos a volátiles de frutas de *Psidium guajava*, una especie hospedadora comúnmente llamada guayaba, incrementan la frecuencia a la cual realizan el comportamiento de cortejo, liberan mayor cantidad de feromona sexual y son preferidos por las hembras para copular por sobre machos que no estuvieron expuestos. Teniendo en cuenta que la técnica de insecto estéril para el manejo sustentable de esta especie se encuentra en desarrollo, la exposición a compuestos volátiles de guayaba podría ser un método útil para incrementar la competitividad sexual de los machos estériles producidos en las biofábricas. Sin embargo, esta posibilidad requiere una evaluación profunda de los mecanismos subyacentes a la estimulación sexual. En esta tesis, se investigaron las bases químicas y fisiológicas de este fenómeno. En primer lugar, se ensayó el potencial uso de un aceite comercial de guayaba como fuente de compuestos volátiles y se evaluó la edad oportuna para realizar la exposición. Además, se investigó el efecto de la exposición sobre la maduración sexual y la resistencia al hambreado de los machos. Por otro lado, se exploró el efecto de la exposición sobre los perfiles de expresión génica de la cabeza de los machos y se estudió si el efecto estimulador depende de su estado nutricional. Además, se investigó el consumo de reservas energéticas sobre machos expuestos y no expuestos. Por último, se identificaron los compuestos responsables del efecto estimulador y las interacciones entre los mismos. Se confirmó un efecto estimulador del aceite de guayaba sobre el comportamiento de cortejo de los machos. Sin embargo, ni la maduración sexual ni la resistencia al hambreado fueron afectados por la exposición. El momento oportuno para realizar el tratamiento de exposición precedió a la maduración sexual de los machos. La exposición a volátiles de guayaba estimuló la expresión de genes relacionados al catabolismo de polisacáridos y a la señalización neuronal mediada por óxido nítrico. El efecto estimulador de la exposición sobre el comportamiento de cortejo dependió de la dieta suministrada a los machos. La estimulación sexual de los machos implicó mayor consumo de sus reservas de carbohidratos y triglicéridos, mientras que no pareció afectar los niveles de proteínas. Por último, se identificaron los compuestos presuntamente responsables del efecto potenciador de la guayaba, R-limoneno y (E/Z)- β -ocimeno. Estos compuestos ejercen su efecto de manera dosis-dependiente y alcanzan un efecto mayor cuando se utilizan juntos. Los resultados de esta tesis no solo aportan información que podría ser de utilidad para el manejo de *A. fraterculus* mediante métodos no contaminantes, sino que también contribuyen a la profundización del conocimiento sobre la biología reproductiva de esta especie.

Palabras clave: mosca de la fruta, comportamiento de cortejo, *Psidium guajava*, maduración sexual, reservas energéticas, transcriptoma, semioquímicos

Chemical and physiological bases of sexual stimulation of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)'s males after exposure to guava volatiles

Anastrepha fraterculus is one of the main fruit pests in South America. Previous studies revealed that males exposed to guava volatiles display courtship behavior more often, release a greater amount of pheromone, and copulate more frequently than unexposed males. Taking into account that the sterile insect technique (SIT) for sustainable management of this species is under development, exposure to guava volatiles could be a useful method to increase the sexual competitiveness of sterile males produced in bio-factories. However, this approach would require a throughout evaluation of the mechanisms underlying this sexual stimulation. This thesis investigated the chemical and physiological bases of this phenomenon. First, the potential use of a commercial guava oil as a source of volatile compounds as well as the opportune age to conduct the exposure were evaluated. The effect of exposure on sexual maturation and starvation resistance of males was also studied. In addition, the impact of the exposure on the gene expression profile of the male head and the extent to which the stimulatory effect depends on the fly's nutritional status were explored. Finally, the compounds responsible for the observed effects and their interactions were identified. A stimulatory effect of guava oil on the courtship behavior of males was confirmed. However, neither sexual maturation nor starvation resistance was affected by the exposure. The more effective male age for treatment preceded sexual maturation. Exposure to guava oil volatiles caused the expression of genes related to polysaccharide catabolism and neuronal signaling mediated by nitric oxide. The effect of exposure on male courtship behavior depended on the diet. The observed stimulation implied a rise in the consumption of carbohydrate and triglyceride stores while protein amount was not affected. Finally, the compounds presumably responsible for the potentiating effect of guava, R-limonene and (E/Z)- β -ocimene, were identified. These compounds showed to exert their effect in a dose-dependent manner and achieved greater effects when used together. The results of this thesis provide information relevant to planning non-polluting strategies to management *A. fraterculus* and further deepen the knowledge of the reproductive biology of this species.

Keywords: fruit flies, courtship behavior, *Psidium guajava*, sexual maturation, energetic reserves, transcriptomic, semiochemical.

Agradecimientos

A mi director, el Dr. Diego Segura, por su guía y apoyo. Por compartir su experiencia y conocimientos conmigo. Por permitir que desarrolle mis ideas libremente y explore nuevos enfoques. Su confianza ha sido determinante para mi desarrollo profesional.

A mis co-directoras de tesis, la Dra. Patricia Fernández y la Dra. Teresa Vera, por recibirme cálidamente en sus laboratorios. Por sus consejos y optimismo.

A todos los miembros del Laboratorio de Insectos de Importancia Agronómica, por los momentos compartidos. Al *team* pecera, por su apoyo académico y anímico, sus consejos y las risas necesarias en momentos difíciles. A Fabian Milla, el mejor técnico del condado, por su ayuda incondicional, invaluable y desinteresada. Al grupo de Ecología Química y Comportamiento de Insectos, cooperación y asistencia. Especialmente al Dr. Guillermo Bachmann, por su colaboración en distintas etapas de esta tesis y por su guía durante los primeros años de doctorado.

A mi consejero de estudios, el Dr. Pablo Schilman, por su paciente escucha y sus valiosos consejos.

A los miembros de la comisión de seguimiento de tesis, el Dr. Julián Mensch y la Dra. Romina Barrozo, por compartir sus experiencias conmigo. Por estar siempre dispuestos a escuchar mis inquietudes y darme tranquilidad en las últimas etapas de esta tesis.

Al Dr. Juan Hurtado y al Lic. Santiago Revale, por su colaboración en el estudio transcriptómico. Por introducirme en el mundo de la bioinformática. Por su compromiso, dedicación, consejos y gran paciencia.

A las Dras. Andrea Pécora y María José Dus Santos del Instituto de Virología de INTA-Castelar, por abrirme las puertas de su laboratorio y generosamente prestarme sus equipos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i) y a la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) por financiar esta tesis.

A Brigitte Schegg, la persona más empática, cariñosa, generosa y desinteresada que conocí en estos años. Por abrirme las puertas de su hermosa casa en Andresito donde escribí gran parte de esta tesis.

A mis amigas que siempre fueron faro. Especialmente a Sonia, con quién compartí este camino de aventuras y desventuras doctorales, por su amistad incondicional e infinita.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional. Especialmente a Juan, quién, en sus múltiples roles, fue mi sostén a lo largo de esta tesis. Pero sobre todo por ser mi hogar.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
AGRADECIMIENTOS	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
INTERACCIÓN PLANTA-INSECTO: EL ROL DE LOS FITOQUÍMICOS	7
EL EFECTO DE LOS FITOQUÍMICOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO Y LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LOS INSECTOS	8
LAS MOSCAS DE LOS FRUTOS (DIPTERA: TEPHRITIDAE): ESTRATEGIAS DE MANEJO SUSTENTABLE	10
FITOQUÍMICOS QUE ESTIMULAN EL COMPORTAMIENTO SEXUAL DE LAS MOSCAS DE LOS FRUTOS COMO HERRAMIENTA PARA EL MANEJO DE PLAGAS	13
ANASTREPHA FRATERCULUS: LA MOSCA SUDAMERICANA DE LOS FRUTOS	16
FITOQUÍMICOS QUE ESTIMULAN EL COMPORTAMIENTO SEXUAL DE A. FRATERCULUS	18
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO I	25
CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA EVG SOBRE EL COMPORTAMIENTO SEXUAL DE LOS MACHOS DESDE UNA PERSPECTIVA APLICADA	25
INTRODUCCIÓN	26
MATERIALES Y MÉTODOS	30
Insectos.....	30
Efecto de la EVG sobre la maduración sexual y el índice de llamado.....	30
Efecto de la EVG sobre la supervivencia en condiciones de hambre.....	33
Rango etario oportuno para realizar el tratamiento de EVG	34
Análisis de Datos.....	34
RESULTADOS	36
Efecto de la EVG sobre la maduración sexual y el índice de llamado.....	36
Efecto de la EVG sobre la supervivencia en condiciones de hambre.....	37
Rango etario oportuno para realizar el tratamiento de EVG	38
DISCUSIÓN	39
CAPÍTULO II	44
ESTIMULACIÓN SEXUAL POR EVG: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LA CABEZA DE LOS MACHOS	44
INTRODUCCIÓN	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
Insectos, comportamiento de llamado y obtención de muestras	48
Extracción de ARN, preparación de bibliotecas de ADNc y secuenciación	49
Control de calidad, ensamblado de novo y anotación del transcriptoma.....	50
Reducción de redundancia, cuantificación y análisis de expresión diferencial	52
RESULTADOS	53
Comportamiento de llamado.....	53
Secuenciación y ensamblado de novo	54
Anotación, análisis de expresión diferencial y enriquecimiento de términos GO	56
DISCUSIÓN	59
CAPÍTULO III	65
ESTIMULACIÓN SEXUAL POR EVG: IMPORTANCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL Y CONSUMO DE RESERVAS ENERGÉTICAS.....	65

INTRODUCCIÓN	66
MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
<i>Efecto de la interacción entre la dieta y la EVG sobre el comportamiento de llamado</i>	69
<i>Efecto de la EVG sobre el consumo de reservas energéticas</i>	70
<i>Análisis de datos</i>	74
RESULTADOS	75
<i>Efecto de la interacción entre la dieta y la EVG sobre el comportamiento de llamado</i>	75
<i>Efecto de la EVG sobre el consumo de las reservas energéticas de los machos</i>	76
DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO IV	85
ESTIMULACIÓN SEXUAL POR EVG: IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS RESPONSABLES	85
INTRODUCCIÓN	86
MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
<i>Frutas, aceite esencial y compuestos sintéticos</i>	89
<i>Colecta de compuestos volátiles</i>	89
<i>Caracterización química y selección de compuestos candidatos</i>	90
<i>Electroantenografía</i>	91
<i>Exposición a compuestos candidatos</i>	93
<i>Exposición a mezclas de compuestos candidatos</i>	94
<i>Análisis de datos</i>	94
RESULTADOS	96
<i>Caracterización química y selección de compuestos candidatos</i>	96
<i>Electroantenografía</i>	102
<i>Exposición a compuestos candidatos</i>	103
<i>Exposición a mezclas de compuestos candidatos</i>	105
DISCUSIÓN	106
CONCLUSIONES GENERALES	113
PERSPECTIVA APLICADA	114
MECANISMOS SUBYACENTES	117
REFERENCIAS	126

Introducción General



Interacción planta-insecto: el rol de los fitoquímicos

La supervivencia y el éxito reproductivo de los insectos fitófagos depende en gran medida de las plantas hospedantes sobre las que éstos se alimentan, se desarrollan o se reproducen. Esta interacción se encuentra principalmente mediada por compuestos químicos producidos por las plantas: los fitoquímicos (Honda et al., 2010; Voelckel y Jander, 2014). Estos compuestos incluyen a los metabolitos primarios como carbohidratos, lípidos y proteínas, los cuales constituyen los principales recursos alimenticios de los insectos fitófagos, y también a los llamados metabolitos secundarios (Nishida, 2014; Tiwari, 2015). Estos últimos son compuestos orgánicos, como alcaloides, terpenoides y fenoles, que no participan directamente del crecimiento o el desarrollo de las plantas, sino que tienen un rol crucial en su adaptación al ambiente y su respuesta al estrés (Waterman, 1992; Bennett y Wallsgrove, 1994; Demain y Fang, 2000; Ashraf et al., 2018). Por ejemplo, las plantas producen una gran variedad de fitoquímicos en respuesta al ataque de patógenos o al daño producido por herbivoría (Kessler y Baldwin, 2002; Chen, 2008; Rehman et al., 2012; War et al., 2012; Schuman y Baldwin, 2016; Dolezal et al., 2019; Divekar et al., 2022). Los metabolitos secundarios pueden funcionar como alomonas¹, repeliendo depredadores o atrayendo a sus enemigos naturales (Birkett et al., 2000; Bruce, 2015; Stevenson et al., 2017), o como feromonas² alertando a conespecíficos de un posible ataque (Broz et al., 2010; Piesik et al., 2011, 2013; Chen et al., 2020a; Sharifi y Ryu, 2021). Además, muchos metabolitos secundarios han sido también identificados como sinomonas³ participando en la atracción de

¹ Compuestos químicos que participan en la comunicación interespecífica beneficiando al emisor.

² Compuestos químicos que participan en la comunicación intraespecífica.

³ Compuestos químicos que participan en la comunicación interespecífica beneficiando tanto al emisor como al receptor.

polinizadores o dispersores de semillas (Harborne, 2001; Whitehead y Bowers, 2013; Stevenson et al., 2017).

La estrecha relación evolutiva entre los fitófagos y sus plantas hospedantes ha llevado, en los insectos, a la aparición de mecanismos fisiológicos que involucran la detección, el secuestro o la detoxificación de metabolitos secundarios vegetales (Nishida, 2014; Reinecke y Hilker, 2014; Zunjarrao et al., 2020). Estos mecanismos les permiten encontrar fuentes de alimento, evitar plantas nocivas o incluso almacenar y transformar fitoquímicos en compuestos beneficiosos para su propio desarrollo (Bruce et al., 2005; Reinecke y Hilker, 2014; Erb y Robert, 2016; Beran et al., 2019; Beran y Petschenka, 2022). Por ejemplo, los pulgones de la especie *Acyrtosiphon nipponicus* obtienen de su único hospedero, *Paederia scandens*, un glucósido iridoide⁴ que luego secretan en la boca de sus depredadores provocándoles la regurgitación. Mediante este comportamiento, los pulgones se liberan de la boca de sus depredadores alejándolos de la colonia (Nishida y Fukami, 1989). Asimismo, las larvas de muchas especies de lepidópteros son capaces de metabolizar y concentrar, en tejidos especializados o glándulas de su cuerpo, fitoquímicos con alta toxicidad para mamíferos, aves y reptiles. Este mecanismo las convierte en poco palatables para sus principales depredadores, favoreciendo su supervivencia (Duffey, 1980; Nishida, 2002, 2014).

El efecto de los fitoquímicos sobre el comportamiento y la fisiología reproductiva de los insectos

Así como los insectos fitófagos pueden secuestrar fitoquímicos ingeridos durante su alimentación y convertirlos en sustancias disuasoras de depredadores, también existen numerosos ejemplos de insectos que los utilizan o transforman en feromonas sexuales

⁴ Monoterpenos bicíclicos derivados del geraniol.

(Landolt y Phillips, 1997; Nishida, 2014; Stökl y Steiger, 2017; Segura et al., 2018). Este es el caso de los machos de varias especies de escarabajos del género *Ips*, los cuales transforman terpenos producidos por sus hospedantes en feromonas terpenoides altamente atractivas para las hembras (Hughes, 1973, 1974; Hendry et al., 1980). Conforme a la especie, estos escarabajos pueden adquirir los fitoquímicos durante sus estadios larvales (utilizándolos luego durante su estado adulto) o bien como adultos ya sea por ingesta o simple exposición a los mismos (Byers et al., 1979; Byers, 1982).

Por otro lado, existen compuestos orgánicos volátiles (VOCs, del inglés *volatile organic compounds*) que son liberados por las plantas y que pueden también afectar la reproducción de los insectos. Los VOCs derivados de plantas hospedantes juegan un rol crucial en la localización de parejas sexuales, zonas de congregación y sitios propicios para la oviposición (Landolt y Phillips, 1997; Xu y Turlings, 2018). Además, los VOCs pueden disparar la síntesis y liberación de feromonas, incrementar la atracción de conespecíficos a la feromona sexual o activar el comportamiento sexual de los insectos (Landolt y Phillips, 1997; Reddy y Guerrero, 2004; Tumlinson, 2014; Moreau et al., 2017; Xu y Turlings, 2018; Borrero-Echeverry et al., 2021). Por ejemplo, durante su actividad sexual, los machos del abejorro sanjaneño (*Melolontha hippocastani*) se congregan en enjambres y se orientan hacia los árboles hospederos donde las hembras permanecen alimentándose (Ruther et al., 2001). Los machos utilizan como principal clave de orientación el (Z)-3-hexen-1-ol, un VOC liberado por sus hospedantes en respuesta al daño mecánico producido por la alimentación de las hembras (Reinecke et al., 2002). Además, Ruther y colaboradores demostraron que la combinación de este compuesto con otro liberado por las hembras (1,4-benzoquinona) desencadena una respuesta sinérgica de orientación de los machos hacia los hospedantes, probablemente

permitiéndoles discriminar entre hospedantes dañados por conespecíficos de aquellos dañados por otros motivos (Ruther et al., 2001).

Las moscas de los frutos (Diptera: Tephritidae): Estrategias de manejo sustentable

Las moscas tefritidas, conocidas como moscas de los frutos, comprenden aproximadamente 5000 especies (Foote y Christenson, 1960; White y Elson-Harris, 1992). Durante su estado larval, algunas de estas especies se alimentan de frutos con valor comercial, por lo que se han ganado el estatus de plaga (White y Elson-Harris, 1992; Aluja y Norrbom, 1999; Díaz-Fleischer y Aluja, 1999; Aluja y Mangan, 2008) (Figura IG.1). Los géneros económicamente más importantes son *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis* y *Rhagoletis*, nativos de América, de Asia y Oceanía, de África y de Eurasia y América respectivamente (Hernandez-Ortiz, 1993; Aluja y Norrbom, 1999; Díaz-Fleischer y Aluja, 1999; Drew, 2004). Más allá de su distribución original, muchas especies tienen la capacidad de establecerse en regiones templadas y tropicales (Bateman, 1972, 1977), por lo que el comercio de frutas contribuye al movimiento de las plagas y al establecimiento de especies exóticas invasoras⁵ en nuevas áreas. Este ha sido un gran desafío para la actividad frutícola de muchos países durante más de 150 años. Dada la amplia gama de hospedantes y el gran impacto económico (debido a las pérdidas en la producción y las restricciones comerciales) de las plagas tefritidas, se realizan, constantemente, grandes esfuerzos para suprimir sus poblaciones silvestres.

⁵ Las especies exóticas invasoras (EEI) son plantas, animales hongos y microorganismos transportados por las personas, de manera voluntaria o accidental, fuera de su área natural de distribución. Muchas de estas especies producen efectos significativos sobre la biodiversidad nativa y serios impactos socioeconómicos, los cuales pueden ser intensos y persistentes (Política Ambiental de Recursos Naturales, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, Argentina).

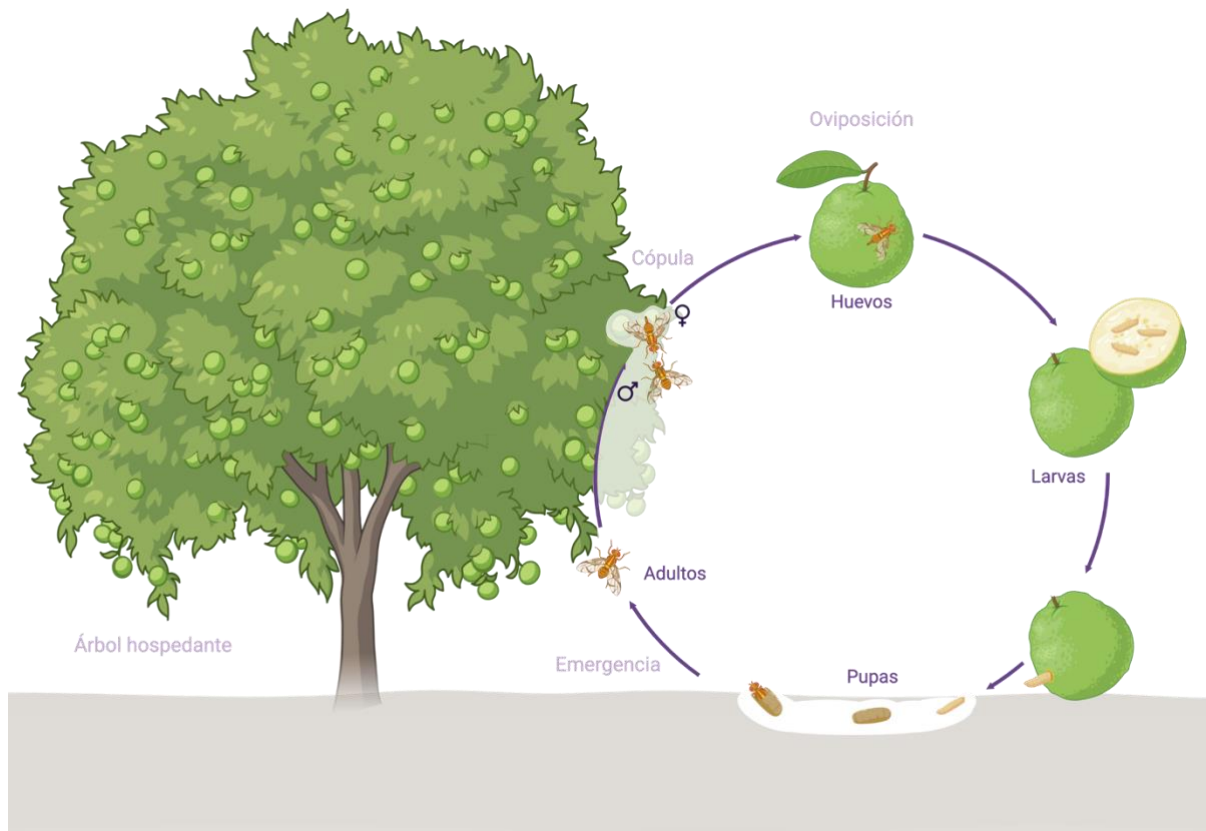


Figura IG.1. Ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*, la mosca sudamericana de los frutos. *A. fraterculus* es un insecto holometábolo que presenta cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. Luego del apareamiento, las hembras depositan sus huevos en el interior de los frutos hospedantes. Entre 48 y 72 h. después, los huevos eclosionan y comienza la etapa larval. La etapa larval, que dura entre 12 y 21 días, comprende 3 estadios larvales (L1, L2 y L3) separados por sucesivas mudas. Las larvas del 3^{er} estadio salen del fruto, se entierran a unos pocos milímetros debajo de la superficie del suelo y esclerotizan su cutícula transformándose en pupas. Durante el estadio pupal importantes cambios fisiológicos y estructurales dan lugar al desarrollo de los adultos (metamorfosis), los cuales emergen luego de aproximadamente 2,5 semanas.

Históricamente, como muchas plagas de insectos, las moscas tefrítidas han sido controladas mediante la aplicación de insecticidas o la utilización de trampas conteniendo atrayentes o cebos tóxicos de amplio espectro (Li et al., 2013; Tan et al., 2014). Sin embargo, la ineludible preocupación por las consecuencias que estos métodos de control tienen sobre los ecosistemas e incluso sobre la salud humana, ha llevado al creciente desarrollo de técnicas especie-específicas y amigables con el ambiente. El manejo de moscas de la fruta mediante el uso de herramientas de manejo sustentable incluye el trampeo con feromonas sintéticas (Tan et al., 2014), el control biológico liberando enemigos naturales (Dias et al., 2018; García et al., 2020) y la técnica de insecto estéril (TIE) (Hendrichs, 2000; Dyck et al., 2014). Esta última

representa, actualmente, el método de control más eficiente (Enkerlin, 2021), aunque para algunas especies aún se encuentra en desarrollo.

El desarrollo de la TIE requiere un profundo conocimiento sobre la biología de la especie blanco y consiste en la cría masiva, la esterilización de los individuos mediante irradiación de pupas y la posterior liberación a campo de los adultos estériles (Knipling, 1955). Una vez liberados, se espera que los machos estériles copulen con las hembras silvestres de la especie blanco, comprometiendo la viabilidad de su descendencia. De este modo, y mediante liberaciones sistemáticas, se obtiene la reducción gradual de la población plaga (Knipling, 1955; Dyck et al., 2014). Así, la TIE será exitosa si los machos estériles liberados consiguen aparearse, por lo que deberán ser sexualmente competitivos frente a los machos silvestres. Para las moscas de los frutos esto no es trivial, ya que la irradiación excesiva y las condiciones de cría masiva han mostrado imponer efectos perjudiciales sobre su competitividad sexual (Barry et al., 2003; Rull et al., 2005; Liedo et al., 2013). De hecho, numerosos trabajos se han enfocado en mejorar el rendimiento sexual de machos tefrítidos criados en condiciones de laboratorio (McInnis et al., 2002; Liendo et al., 2013; Pereira et al., 2013; Teal et al., 2013; Segura et al., 2018; Arredondo et al., 2020). En este sentido, las dietas suplementadas con proteínas o probióticos (Levy et al., 2005; Perez-Staples et al., 2007, 2008; Yuval et al., 2007; Deutscher et al., 2019), los tratamientos hormonales (Chacón-Benavente et al., 2013; Segura et al., 2013; Teal et al., 2013; Bachmann et al., 2017; Gomez-Simuta et al., 2017; Adnan et al., 2020) y la exposición a fitoquímicos como estimulantes sexuales (Shelly y McInnis, 2001; Shelly, 2006; Segura et al., 2018) constituyen las principales herramientas para lograr dicho objetivo.

Fitoquímicos que estimulan el comportamiento sexual de las moscas de los frutos como herramienta para el manejo de plagas

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento de machos con fitoquímicos ha demostrado ser una estrategia exitosa para estimular el rendimiento sexual de varias especies de tefritidos (Papadopoulos et al., 2006a; Shelly, 2006; Silva et al., 2013; Segura et al., 2018). Por ejemplo, cuando los machos de ciertas especies del género *Bactrocera* son alimentados con metil eugenol (ME), éstos aumentan la cantidad de VOCs liberados durante el cortejo, cortejan con mayor frecuencia y su éxito copulatorio se ve incrementado (Shelly y Dewire, 1994; Shelly y Whittier, 1996; Raghu y Clarke, 2003; Shelly, 2010; Orankanok et al., 2013). El ME es un poderoso atrayente de machos sexualmente maduros (pero no de hembras) y se encuentra ampliamente distribuido entre diversas especies de plantas donde moscas silvestres de dicho género fueron observadas alimentándose (Nishida et al., 1997; Shelly, 2000, 2001a, 2001b, 2001c; Tan et al., 2014). Luego de la ingesta, los machos metabolizan el ME, y sus derivados [2-Alil-4,5 dimetoxifenol (DMP), (E)-Coniferol (E-CF), (Z)-Coniferol (Z-CF) y el alcohol (Z)-3,4-dimetoxycinámico (Z-DMC), dependiendo de la especie] son almacenados en la glándula rectal, conocida por ser un reservorio de feromonas sexuales (Nishida et al., 1988; Tan y Nishida, 1996; Wee y Tan, 2005; Tokushima et al., 2010; Tan et al., 2011) (Figura IG.2). Aunque el rol de los derivados del ME en la comunicación intraespecífica no está claro, algunos autores sugieren que estos compuestos podrían funcionar como señales de larga distancia y estar involucrados en la formación de leks⁶ (Wee et al., 2018b).

⁶ Áreas comunes dónde dos o más machos de una determinada especie se agrupan para realizar comportamientos de cortejo.

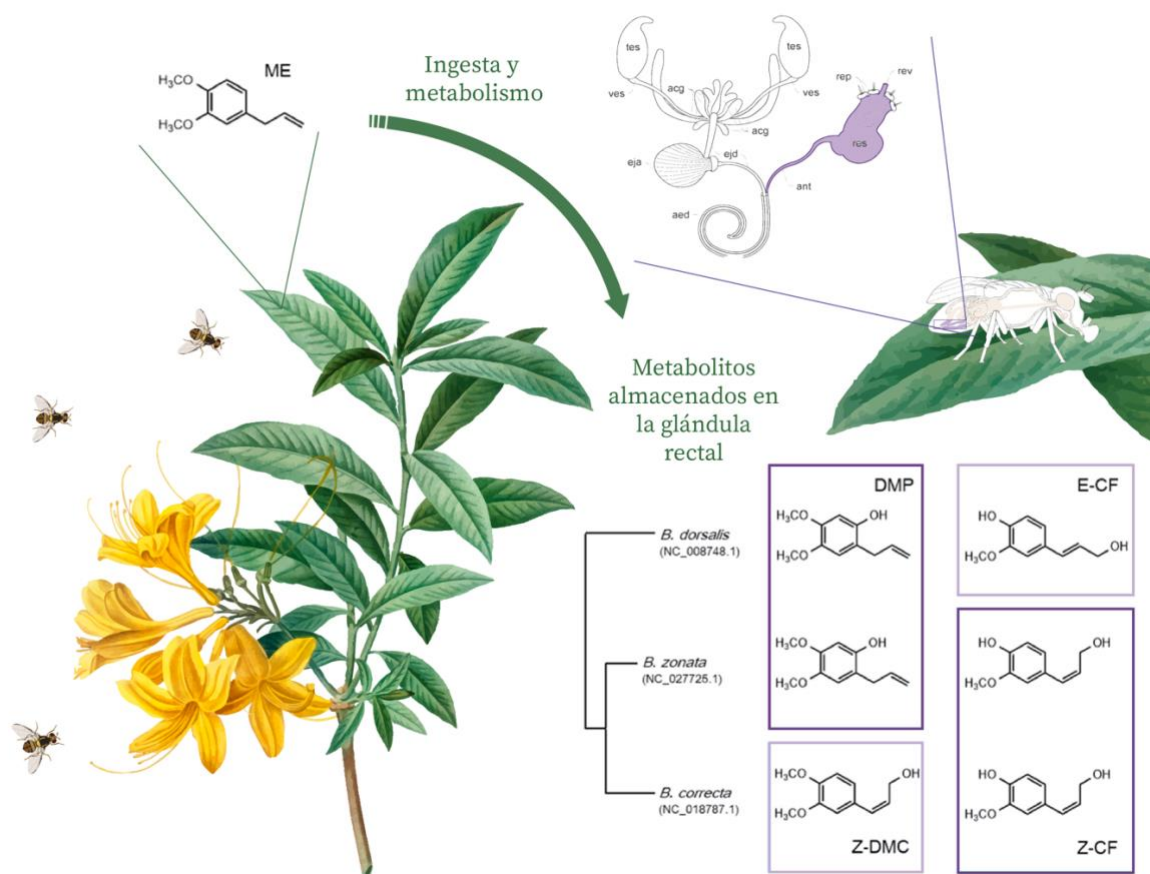


Figura IG.2. Adquisición de metil eugenol (ME) y secuestro de sus metabolitos en especies del género *Bactrocera*. Las figuras fueron extraídas de Ono *et al.* (2021) y Scolari *et al.* (2021) y modificadas. Sistema reproductivo masculino y recto: tes (testículos), ves (vasos deferentes), acg (glándulas accesorias), ejd (ducto eyaculatorio), eja (apodema eyaculatorio), aed (edeago); Recto: rev (válvula rectal), rep (papila rectal), res (reservorio conteniendo feromonas), ant (tubo anal). El árbol filogenético fue construido a partir de secuencias de ADN mitocondrial por el método de máxima verosimilitud, los códigos de acceso a las secuencias se indican entre paréntesis. ME: Metil Eugenol, DMP: 2-*alil*-4,5 dimetoxifenol, Z-DMC: alcohol (Z)-3,4-dimetoxicinámico, E-CF: (E)-coniferol, Z-CF: (Z)-coniferol.

Para otras especies de tefrítidos, la ingesta de los compuestos no es necesaria y el mismo efecto sobre el comportamiento reproductivo puede lograrse mediante la exposición a fitoquímicos volátiles. De hecho, quizás el mejor ejemplo del uso de fitoquímicos en un contexto de TIE sea el de la estimulación sexual de machos de *Ceratitis capitata* por exposición a VOCs de aceite de raíz de jengibre (más conocido como GRO por sus siglas en inglés) (Shelly, 2001a; Shelly y McInnis, 2001; Shelly *et al.*, 2003; Shelly y Villalobos, 2004; Papadopoulos *et al.*, 2006b; Paranhos *et al.*, 2013). El GRO ha sido testeado como estimulante del comportamiento sexual debido a su alto contenido de α -copeno, un fitoquímico

distribuido entre los hospedantes de *C. capitata* que actuaría como señal de larga distancia en la agregación de machos en sitios de formación de leks (Nishida et al., 2000; Shelly, 2001a). La estimulación sexual de los machos por exposición a α -copeno o GRO implica un aumento en la frecuencia de cortejo y en el éxito de apareamiento (Shelly y McInnis, 2001; Papadopoulos et al., 2006b; Juan-Blasco et al., 2013; Paranhos et al., 2013). Además, los machos expuestos a VOCs liberados por GRO presentan mayor atractividad para hembras conespecíficas que los machos no expuestos (Shelly, 2001a) (Figura IG.3). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos que subyacen a esta respuesta son inciertos y han sido poco explorados (Briceño et al., 2007; Segura et al., 2018).

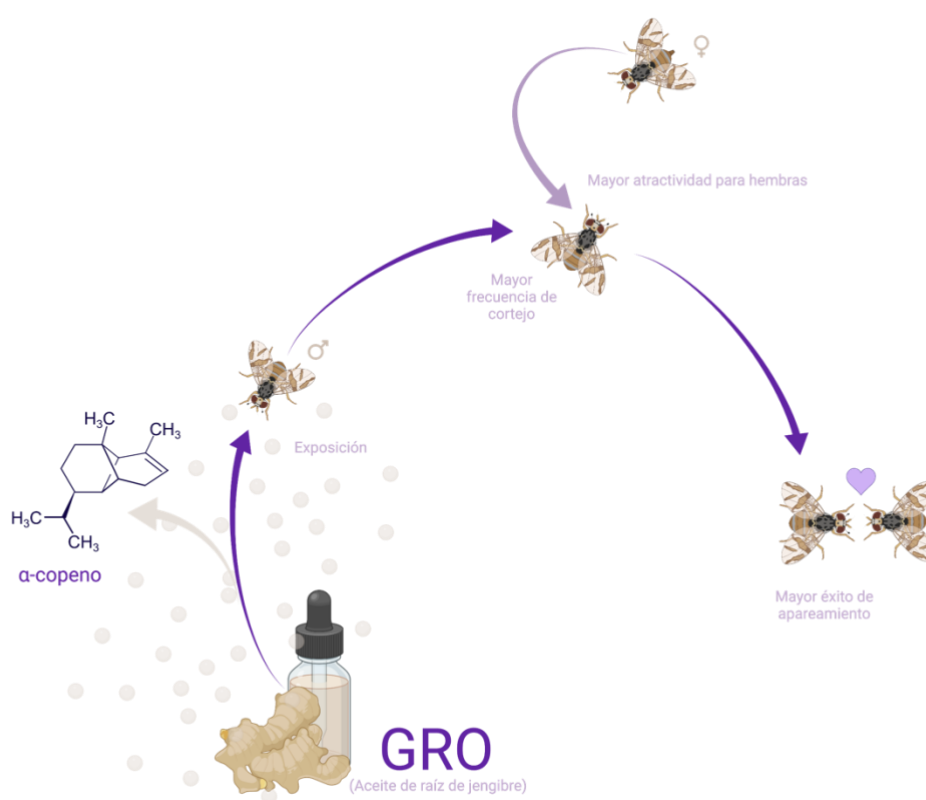


Figura IG.3. Efecto de la exposición a aceite de raíz de jengibre (GRO) sobre el comportamiento sexual de machos de *Ceratitis capitata*. El GRO contiene altas proporciones de α -copeno, un compuesto presente en plantas hospedantes de *C. capitata*.

La posibilidad de utilizar fitoquímicos como estimuladores del comportamiento sexual y el éxito de apareamiento en un contexto TIE ha llevado a la búsqueda de compuestos

sexualmente estimulantes en numerosas especies plaga de moscas de la fruta. De hecho, la exposición a VOCs de GRO ha sido testeada sobre varias especies plaga del género *Anastrepha* (*A. fraterculus*, *A. ludens*, *A. obliqua* y *A. serpentina*) pero solo una de ellas se mostró sexualmente estimulada por este tratamiento: *Anastrepha serpentina* (Mendoza, 2010; Flores et al., 2011; Ruiz et al., 2021). Además, como el efecto de los fitoquímicos sobre el comportamiento sexual y la fisiología reproductiva de los tefrítidos podría ser el resultado de la adaptación de cada especie a sus hospedantes, los fitoquímicos derivados de éstos últimos suelen ser testeados como compuestos candidatos (Segura et al., 2018). De este modo, se encontró que los machos de *Bactrocera oleae* y *Anastrepha ludens* aumentan su éxito de apareamiento cuando son expuestos a VOCs liberados por sus hospedantes. En el caso de la especie monófaga *B. oleae*, los machos aumentan su éxito copulatorio frente a la exposición a α -pineno, un compuesto emitido por las frutas del olivo (*Olea europaea*) (Gerofotis et al., 2013). Similarmente, los machos de *A. ludens* pueden ser sexualmente estimulados en condiciones seminaturales mediante la exposición a aceite esencial de pomelo (*Citrus paradisi*), uno de sus hospedantes preferidos (Morató et al., 2015).

***Anastrepha fraterculus*: La mosca Sudamericana de los frutos**

Anastrepha fraterculus, comúnmente conocida como la mosca sudamericana de la fruta, es un complejo de especies crípticas endémico de regiones tropicales y sub-tropicales de América (Aluja y Norrbom, 1999; Steck, 1999; Hernández-Ortiz et al., 2020). Si bien este complejo está formado por al menos 8 morfotipos, en Argentina se ha identificado la presencia de solo uno de ellos: el morfotipo brasileño 1 o también denominado *Anastrepha fraterculus* sp. 1 (Steck, 1991, 1999; Hernandez-Ortiz, 1993; Hernández-Ortiz et al., 2015; Prezotto et al., 2019).

Gran parte de las especies frutales que utiliza *A. fraterculus* como hospedantes poseen un alto valor comercial por lo que esta especie es considerada una plaga cuarentenaria⁷ (Guillen y Sanchez, 2007; Perez-Staples et al., 2019). En Argentina, el plan nacional de protección fitosanitaria incluye el monitoreo y control poblacional de *A. fraterculus* en regiones frutícolas del país a través del Programa Nacional de Control y Erradicación de Moscas de la Fruta (PROCEM, SENASA). Este programa se basa en el trampeo masivo y la aplicación terrestre y aérea de un insecticida de origen biológico llamado Spinosad (SENASA, 2023). Este insecticida es considerado de bajo impacto ambiental por su fácil y rápida degradación, así como de baja toxicidad para mamíferos y aves (Thompson et al., 2000; Sarfraz et al., 2005). Sin embargo, algunos estudios han alertado sobre el impacto negativo que las aplicaciones con Spinosad pueden tener sobre artrópodos no-blanco y poblaciones de insectos benéficos para los cultivos (Biondi et al., 2012; Tomé et al., 2015; Lopes et al., 2018; Marques et al., 2020; Cappa et al., 2022; Serrão et al., 2022). Además, el uso extensivo de este bio-insecticida⁸ ha provocado el desarrollo de resistencia en varias especies de los géneros *Bactrocera* y *Ceratitidis* (Hsu y Feng, 2006; Kakani et al., 2010; Kampouraki et al., 2018; Guillem-Amat et al., 2020). Por esto, la aplicación de una técnica como la TIE para el manejo de *A. fraterculus* permitiría un control más específico y ambientalmente limpio que los métodos actualmente disponibles. Afortunadamente, el desarrollo de la TIE para el manejo de *A. fraterculus* ha progresado considerablemente en la última década. Numerosos trabajos han logrado avances significativos en los protocolos de cría masiva e irradiación, el desarrollo de cepas de sexado genético y la comprensión profunda sobre la biología reproductiva de esta especie (Cladera

⁷ Según el Sistema Argentino de Información Jurídica (Resolución 66/1993): “Aquella que puede tener importancia económica nacional para el país que corre el riesgo que esa plaga entraña, cuando aún la plaga no existe (A1) o, si existe, no está extendida y se encuentra bajo control activo (A2)”

⁸ Insecticida de origen biológico, conformado por organismos vivos o sustancias sintetizadas por ellos.

et al., 2014; Bachmann et al., 2015, 2017; Mastrangelo et al., 2018, 2019, 2021; Costa et al., 2020; Meza et al., 2020). Incluso, el Centro de Energía Nuclear na Agricultura de la Universidad de São Paulo (CENA-USP) en Brasil realiza pruebas piloto para la liberación a campo de machos estériles de *A. fraterculus* (Dr. Mastrangelo, comunicación personal).

Fitoquímicos que estimulan el comportamiento sexual de *A. fraterculus*

Como muchas especies de tefrítidos plaga, *A. fraterculus* exhibe un sistema de apareamiento de tipo lek, en el que los machos sexualmente maduros se agrupan en sitios específicos para atraer y cortejar a las hembras (Malavasi et al., 1983; Arita y Kaneshiro, 1989; Yuval et al., 1998; Díaz-Fleischer y Aluja, 1999; Sivinski et al., 1999). Luego de alcanzar la madurez sexual, entre 3 y 8 machos se agrupan en un mismo árbol (generalmente en hojas adyacentes de una misma rama) desde donde atraen a las hembras exhibiendo movimientos estereotipados y liberando feromonas, un comportamiento al que comúnmente se lo denomina “llamado” (Segura et al., 2007; Gomez Cendra et al., 2011). A diferencia de otras especies del género (Aluja et al., 1993; Aluja y Norrbom, 1999; Sivinski et al., 1999), la actividad sexual de *A. fraterculus* ocurre durante la mañana, concentrándose en la primera hora luego del amanecer (Malavasi et al., 1983; Segura et al., 2007; Bachmann et al., 2015). Durante el llamado, los machos expanden la región pleural abdominal y extruyen el tejido anal sosteniendo una gota en el extremo inferior del abdomen (Gomez Cendra et al., 2011). Además, realizan rápidos movimientos alares conocidos como “*fanning*” (del inglés abanicar) (Figura IG.4).

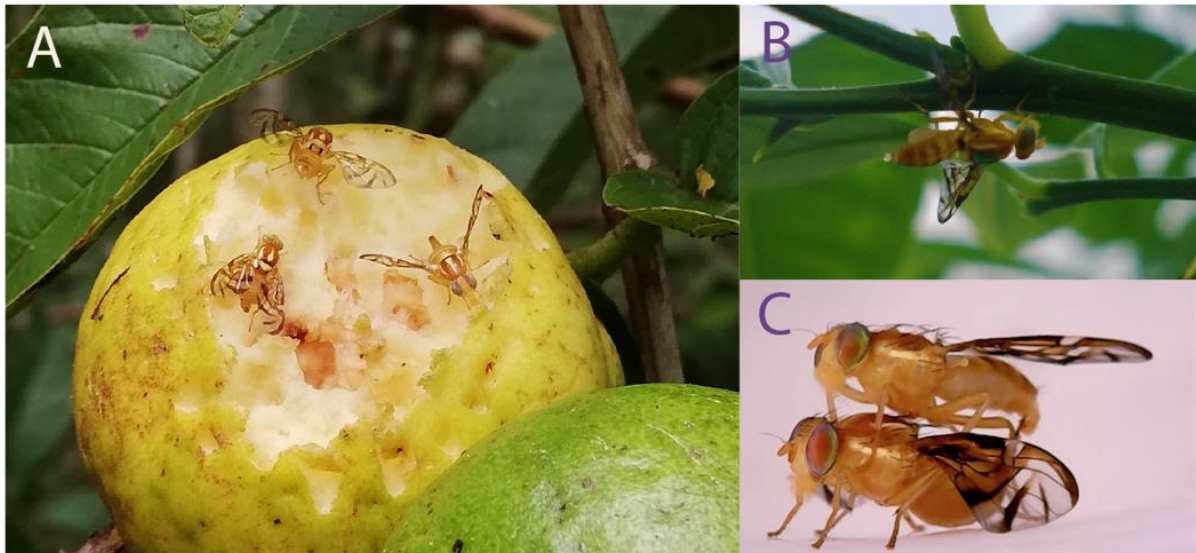


Figura IG.4. *Anastrepha fraterculus*. Sobre frutos de guayaba (A); expandiendo la región pleural abdominal y el tejido anal durante el cortejo (B); apareándose (C). Fotos: J. Bolaños, Fundación Charles Darwin 2021 (A), V. Dias, Universidad de Florida, 2017 (B), S. A. Belliard, Universidad de Buenos Aires, 2017 (C).

En los últimos diez años, junto con el avance en el desarrollo de la TIE para *A. fraterculus*, se ha estudiado la posibilidad de incrementar el éxito copulatorio de los machos de esta especie mediante la exposición a fitoquímicos. Vera y colaboradores realizaron un estudio para evaluar el efecto de la exposición (con y sin contacto) de los machos a dos frutos hospederos, uno nativo de América, guayaba (*Psidium guajava*), y otro nativo de Asia introducido en América en el siglo XVI, mango (*Mangifera indica*). Este estudio reveló que los machos expuestos a volátiles de guayaba, pero no a volátiles de mango, presentan un mayor éxito copulatorio en relación con los machos no expuestos (Vera et al., 2013). En un estudio posterior, Bachmann y colaboradores, confirmaron el incremento en el éxito de apareamiento para machos expuestos a guayaba y lograron, aunque con menor potencia, replicar dicho efecto exponiendo a los machos a los volátiles de una mezcla sintética de compuestos representativos de la fruta (Bachmann et al., 2015). Además, demostraron que los machos que fueron expuestos a volátiles de guayaba realizan el comportamiento de llamado más frecuentemente y liberan mayor cantidad de feromonas que los machos que no

estuvieron expuestos (Bachmann et al., 2015) (Figura IG.5). Aunque el éxito de apareamiento de los machos correlaciona con el tiempo que éstos pasan llamando dentro del lek (Segura et al., 2007), los mecanismos por los cuales las hembras eligen un macho por sobre otro aún no están claros. Recientemente, Bachmann y colaboradores encontraron una mayor fecundidad en hembras que se apareaban con machos expuestos a volátiles de guayaba, evidenciando por primera vez, un beneficio directo para las hembras que eligen a machos que estuvieron expuestos (Bachmann et al., 2019).

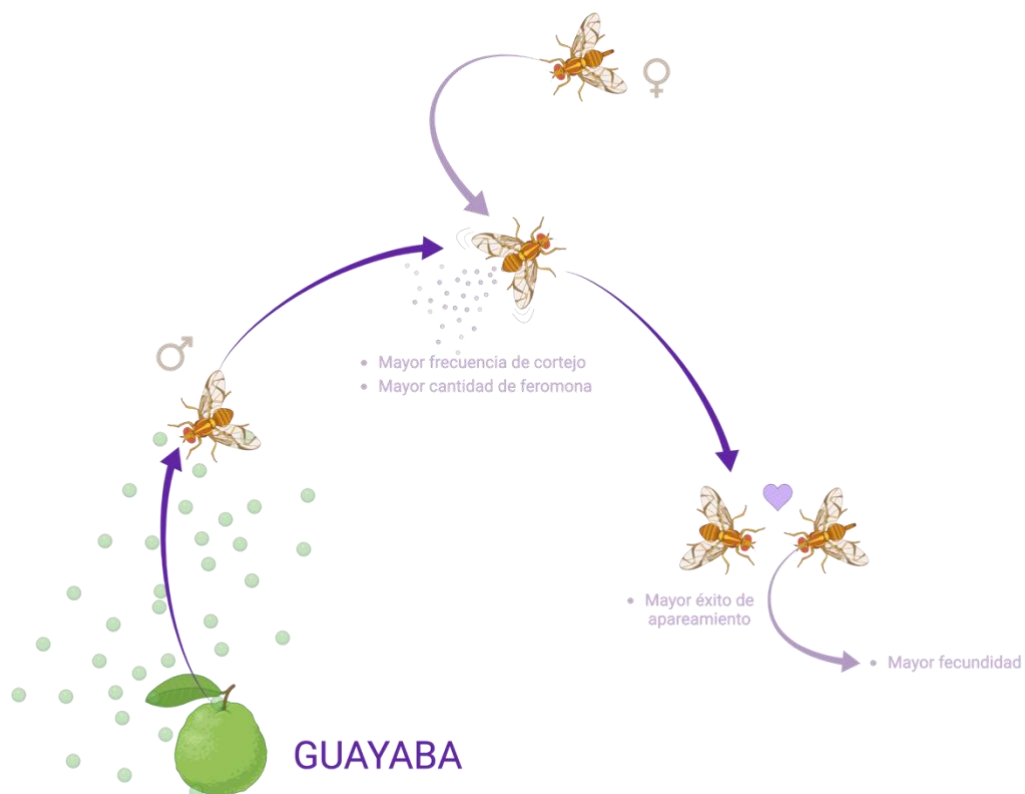


Figura IG.5. Efecto de la exposición a frutos de guayaba sobre el comportamiento sexual de *Anastrepha fraterculus*.

Así, el tratamiento de exposición a volátiles de guayaba tiene la potencialidad de ser implementado en un contexto de TIE para el manejo sustentable de *A. fraterculus*. Sin embargo, aún se necesitan estudios que profundicen sobre la factibilidad de su implementación y posibles efectos sobre otras características requeridas por la técnica (por

ejemplo, la supervivencia). Además, alcanzar una mayor comprensión sobre cuáles son las bases químicas y los mecanismos fisiológicos que subyacen al fenómeno de estimulación sexual de los machos permitiría, avanzar sobre el manejo de *A. fraterculus* mediante técnicas sustentables y conocer mejor la biología reproductiva de esta especie desde una perspectiva ecológica y evolutiva.

Objetivos e Hipótesis

Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es comprender los mecanismos subyacentes a la estimulación sexual de machos de *A. fraterculus* tras la exposición a compuestos volátiles de guayaba (desde ahora EVG). En particular, este trabajo pretende desentrañar las bases químicas y fisiológicas de la estimulación sexual que ocurre al exponer machos de *A. fraterculus* a frutas de guayaba. Se busca no solo aportar información que permita mejorar el manejo de esta plaga por métodos no contaminantes, sino también comprender más profundamente la biología reproductiva de esta especie.

Objetivos Específicos

Capítulo I

- I.1 Ensayar el potencial uso de un aceite esencial comercial de guayaba como una fuente de compuestos volátiles capaz de estimular el comportamiento sexual de los machos.
- I.2 Evaluar el rango etario oportuno para estimular el comportamiento sexual de los machos mediante un tratamiento por EVG.
- I.3 Evaluar el efecto de la EVG sobre la maduración sexual de los machos.
- I.4 Evaluar el efecto de la EVG sobre la supervivencia de los machos en condiciones de hambreado.

Capítulo II

- II.1 Evaluar el efecto de la EVG sobre la expresión génica de los machos.

- II.2 Identificar la función de los genes potencialmente involucrados en la respuesta de los machos a la EVG.

Capítulo III

- III.1 Evaluar si el efecto de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos depende del estado nutricional de los mismos.
- III.2 Evaluar si el efecto estimulador de la EVG está asociado al consumo de reservas energéticas.

Capítulo IV

- IV.1 Identificar los compuestos químicos responsables del efecto producido por la EVG.
- IV.2 Evaluar el efecto de la exposición a compuestos candidatos sintéticos sobre el comportamiento sexual de los machos.

Hipótesis

Capítulo I

- I.1 La exposición de machos de *A. fraterculus* a compuestos volátiles de un aceite comercial de guayaba estimula su comportamiento sexual.
- I.2 El efecto estimulador de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus* depende del rango etario en el que se realiza el tratamiento.
- I.3 La EVG acelera la maduración sexual de los machos de *A. fraterculus*.
- I.4 La EVG no afecta la supervivencia de los machos de *A. fraterculus* en condiciones de hambre.

Capítulo II

II.1 El efecto estimuladorio de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus* está mediado por cambios en la expresión génica del sistema nervioso central.

Capítulo III

III.1 El efecto estimuladorio de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus* depende del estado nutricional de los mismos al momento de la exposición.

III.2 La estimulación sexual de los machos de *A. fraterculus* tras la EVG se produce a expensas del consumo de sus reservas energéticas.

Capítulo IV

IV.1 El efecto estimuladorio de la EVG puede ser reproducido por algunos de los VOCs (compuestos candidatos) liberados por las frutas de guayaba cuando son administrados de manera individual.

IV.2 El efecto estimuladorio de la exposición a compuestos candidatos sobre el comportamiento sexual de machos de *A. fraterculus* depende de la dosis de exposición.

IV.3 Existe interacción entre compuestos estimuladorios candidatos.

Capítulo I

Caracterización del efecto de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos desde una perspectiva aplicada

Los resultados de este capítulo se encuentran publicados en

Belliard S. A., Fernández P. C., Vera M. T. y Segura D. F. (2022). Timing of exposure and nutritional status affect male response to guava volatiles, a known courtship enhancer of *Anastrepha fraterculus*
Journal of Pest Science, 95(1), 279-290

Introducción

Los avances en el desarrollo de la TIE para el control poblacional de *A. fraterculus* han llevado a la búsqueda de fitoquímicos capaces de estimular el comportamiento sexual de los machos. Como resultado de esta búsqueda se encontró que los machos expuestos a volátiles de frutas de guayaba incrementan la frecuencia de cortejo, la liberación de feromonas sexuales y el éxito de apareamiento (Vera et al., 2013; Bachmann et al., 2015). Así, la EVG se ha propuesto como un potencial tratamiento para estimular sexualmente a los machos criados masivamente en un contexto de control por TIE. Sin embargo, aunque el tratamiento de EVG es claramente estimulador del comportamiento sexual para *A. fraterculus*, aún se requiere la evaluación de ciertos aspectos que podrían comprometer la factibilidad de su implementación. Por un lado, aspectos prácticos relacionados al manejo de esta herramienta en el contexto de una cría masiva y por el otro, aspectos subyacentes a la EVG. Por ejemplo, dicho tratamiento podría afectar, además de la competitividad sexual, la supervivencia de los machos.

Una cuestión a tener en cuenta es la fuente de volátiles de guayaba que podría ser utilizada durante un tratamiento de EVG en un entorno de cría masiva. Los árboles de guayaba fructifican una o dos veces por año y producen frutos climatéricos⁹ (Akamine y Goo, 1979; Jain et al., 2003; Singh y Pal, 2008) es decir que éstos continúan madurando una vez recolectados. Los compuestos volátiles liberados por los frutos y su concentración cambian a medida que avanza la maduración de los mismos, lo cual probablemente altere el ambiente volátil percibido por los machos y consecuentemente el efecto sobre su comportamiento. Por esto, utilizar frutas como fuente de compuestos volátiles de guayaba en una cría masiva

⁹ Esta clasificación podría variar en función del cultivo estudiado (Azzolini et al., 2005; Paul et al., 2011)

conllevaría un costo logístico difícilmente sostenible en el tiempo. Una alternativa para que el tratamiento de EVG pueda implementarse como parte de un protocolo de cría es utilizar como fuente de volátiles productos homogéneos, fáciles de almacenar, manipular y administrar. Por ejemplo, el comportamiento sexual de machos de *C. capitata* puede ser estimulado mediante la exposición a un fitoquímico llamado α -copeno, sin embargo, este compuesto es difícil de sintetizar u obtener en grandes cantidades (Segura et al., 2018). Consecuentemente, en crías masivas de machos estériles de *C. capitata* se ha utilizado exitosamente un aceite esencial comercial que contiene α -copeno, el aceite de raíz de jengibre (GRO) (Shelly et al., 2004b).

Otra cuestión a considerar es si el momento oportuno (el rango etario de los machos) para realizar un tratamiento efectivo con fitoquímicos es compatible con los protocolos de cría masiva para el control por TIE. Por ejemplo, el efecto estimulador de la exposición a GRO sobre el éxito de apareamiento de *C. capitata* se mantiene aún si la exposición se realiza cuando los machos son sexualmente inmaduros (Shelly, 2001a; Shelly y McInnis, 2001). Contrariamente, los machos de *Bactrocera dorsalis* alimentados con metil eugenol (ME) experimentan un aumento en su competitividad sexual solo si ingieren este compuesto a edades sexualmente maduras (Shelly y Nishida, 2004). Esto implica que para estimular la competitividad sexual de *B. dorsalis* usando ME en un contexto de TIE, los machos deberían permanecer al menos 6 días en las instalaciones de una biofábrica, lo que incrementa los costos de mantenimiento en términos de espacio, alimento y mano de obra (Faria et al., 2008; Pereira et al., 2021). Entonces, conocer cuál es el momento oportuno para realizar el tratamiento con fitoquímicos de modo que se maximice el efecto, pero se minimicen los costos de mantenimiento, no es trivial. Si el tratamiento con fitoquímicos fuera efectivo sólo cuando se aplica sobre machos sexualmente maduros, el rendimiento del tratamiento

debería superar el costo que requiere mantener a los machos hasta su madurez. Varias especies de moscas de la fruta, particularmente de los géneros *Anastrepha* y *Bactrocera*, requieren varios días después de la emergencia de los adultos hasta alcanzar la madurez sexual (Teal et al., 2013). Así, para este tipo de especies si la liberación de los machos se realiza a edades inmaduras, éstos deberán ser capaces de sobrevivir hasta alcanzar la madurez sin perjudicar su competitividad sexual, de lo contrario la eficiencia de la TIE disminuiría (Knipling, 1955). Una forma de minimizar los costos asociados al mantenimiento de los machos es acelerando su maduración sexual. Esto reduciría el tiempo de permanencia en la biofábrica y, en ciertos casos, permitiría el tratamiento con fitoquímicos antes de su liberación. En este sentido, algunos fitoquímicos que estimulan el comportamiento sexual de moscas tefrítidas han mostrado, también, capacidad para acelerar su maduración. Este es el caso de los machos de *Bactrocera tryoni* cuando reciben una dieta suplementada con cetona de frambuesa (RK por sus siglas en inglés), que no solo aumentan su competitividad sexual, sino que también anticipan su maduración (Akter et al., 2017; Khan et al., 2019).

Por otro lado, el tratamiento con fitoquímicos, ya sea para acelerar la maduración de los machos o aumentar su desempeño sexual, no debería reducir su probabilidad de sobrevivir en el campo, ya que, una vez liberados, los machos necesitarán vivir lo suficiente para madurar y aparearse. Por esto, en las biofábricas, se realizan pruebas de supervivencia bajo condiciones de estrés nutricional como un parámetro de calidad de los machos estériles que serán liberados a campo (FAO/IAEA/USDA, 2019). Si bien la supervivencia de los machos depende fuertemente de su estado nutricional, también puede ser modulada por claves olfativas, las cuales juegan un rol crítico en la interpretación de las condiciones ambientales (Libert y Pletcher, 2007). Entonces, al testear nuevas sustancias como potenciadores sexuales debería también abordarse su potencial efecto sobre la supervivencia de los machos tratados.

De hecho, el efecto de la exposición a GRO sobre la supervivencia de *C. capitata* ha sido estudiado en diferentes contextos dietarios, encontrando que el tratamiento con GRO no afecta la supervivencia de los machos en el campo independientemente de la dieta suministrada (Paranhos et al., 2010; Silva et al., 2013).

Este capítulo tuvo como objetivo caracterizar el efecto de la EVG sobre el comportamiento sexual de *A. fraterculus* desde una perspectiva aplicada. Para esto, en primer lugar, se ensayó la efectividad de un aceite comercial de guayaba como fuente de volátiles alternativa a la fruta. Además, se estudió el potencial de la EVG para acelerar la maduración sexual de los machos y su influencia sobre su supervivencia en condiciones de hambreado. Por último, se investigó cuál es el rango etario de los machos más oportuno para realizar un tratamiento efectivo de EVG. Como se mencionó anteriormente, la TIE aún se encuentra en desarrollo para *A. fraterculus* y, en la actualidad, Argentina no cuenta con una cría masiva de esta especie ni con instalaciones que utilicen protocolos de irradiación específicos y validados para la esterilización de los machos. Por esto, en esta tesis se utilizaron machos no esterilizados de *A. fraterculus* sp. 1 provenientes de una colonia mantenida en el laboratorio como modelo de estudio. Por un lado, esterilizar machos criados en el laboratorio utilizando métodos no validados podría tener consecuencias negativas sobre las características biológicas estudiadas debido a la irradiación excesiva (Collins et al., 2009; Ernawan et al., 2017). Por otro lado, protocolos específicos de irradiación utilizados sobre otras especies mostraron no afectar los patrones de cortejo (Lux et al., 2002) ni la competitividad sexual de los machos (Bouyer y Vreysen, 2020). En un estudio reciente, Diallo y colaboradores, mostraron que la reducción de la calidad de los machos estériles de *Glossina palpalis gambiensis* en contextos de TIE se encuentra relacionada principalmente con procesos de cría masiva, manejo y liberación; y no con la irradiación en sí misma (Diallo et al., 2019). Así, utilizar machos no estériles

provenientes de una cría de laboratorio como modelo de estudio permitirá avanzar en la identificación de factores relevantes que modulan el efecto de la EVG mientras se completa el desarrollo de la TIE. Sin embargo, cuando los protocolos específicos de manejo para esta especie se encuentren disponibles, las conclusiones de este capítulo deberán validarse sobre machos de *A. fraterculus* criados masivamente y esterilizados.

Materiales y métodos

Insectos

Para todos los experimentos se utilizaron individuos de *A. fraterculus* sp 1. Los insectos se obtuvieron a partir de una colonia mantenida en el Laboratorio de Insectos de Importancia Agronómica del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA-Castelar). Esta colonia fue establecida en 1997 a partir de pupas provenientes de guayabas de la localidad de Horco Molle (Tucumán, Argentina).

Efecto de la EVG sobre la maduración sexual y el índice de llamado.

Para estimar el efecto de la EVG sobre la maduración sexual de machos de *A. fraterculus*, moscas macho recientemente emergidas fueron transferidas, al azar y en grupos de 5 individuos (una réplica), a frascos de vidrio de 3 L provistos con agua y alimento [azúcar (Ledesma S.A., Jujuy, Argentina) y levadura de cerveza (CALSA, Tucumán, Argentina) (3:1)]. Para registrar el comportamiento individual de cada macho dentro de cada grupo, los machos fueron identificados mediante una marca de color realizada sobre el nototórax utilizando témpera al agua (Alba, Buenos Aires, Argentina). Cada grupo de 5 machos fue asignado al azar a uno de dos posibles tratamientos: 1) Exposición a volátiles de guayaba (EVG) o 2) Sin exposición (control). Los grupos de cada tratamiento fueron mantenidos dentro de

incubadoras (Sanyo MLR350, Japón) a 25 ± 1 °C y un fotoperíodo de 12 h luz :12 h oscuridad.

En el caso de los grupos EVG, la exposición fue realizada diariamente durante 4 horas (de 12:00 a 16:00) desde el día 1 hasta el día 11 post-emergencia de los adultos.

Para realizar la exposición a volátiles de guayaba se utilizaron frutas (FG) provenientes de la localidad de Horco Molle ($26^{\circ}49'0''S$ $65^{\circ}19'0''E$, Tucumán, Argentina) adaptando la metodología empleada por Vera et al. (2013) y Bachmann et al. (2015, 2019). Para ello, 3 g de fruta cortada en pequeñas piezas fueron colocados en un recipiente plástico cubierto con tul (de modo que las moscas no tengan contacto físico con la fuente de volátiles) e introducido dentro de cada frasco conteniendo el grupo de machos que serían expuestos. Con el objetivo de evaluar la posibilidad de utilizar una fuente de volátiles alternativa al uso de fruta, este experimento fue repetido utilizando como fuente de exposición un aceite comercial de guayaba (AG) (Salvia Cosmeceuticals, Delhi, India). Para esto, 20 μ l de AG fueron colocados sobre un papel de filtro de 2 cm $\times$ 2 cm (Whatman, Kent, Reino Unido) dentro de una placa de Petri, la cual fue cubierta con tul e introducida dentro de cada frasco. Durante la exposición de FG o AG, un recipiente de plástico vacío y una placa de Petri con papel de filtro limpio fueron colocados respectivamente en los frascos de cada grupo control.

Comenzando el día 2 y continuando hasta el día 12 post-emergencia, se observó la ocurrencia del comportamiento de llamado para cada macho 1 vez cada 20 min durante la primera hora de luz (4 veces para cada macho entre las 8:30 y las 9:30), momento en que los machos de esta especie concentran su actividad sexual (Malavasi et al., 1983; Gomez Cendra et al., 2011; Passos Roriz et al., 2018). Dado que el comportamiento de llamado de *A. fraterculus* consiste en actividades estereotipadas que involucran movimientos intensos de las alas, la expansión de la región pleural abdominal y la extrusión el tejido anal sosteniendo una gota (Segura et al., 2007; Gomez Cendra et al., 2011; Bachmann et al., 2015), un macho fue considerado

“llamando” cuando se lo observó alguno de estos tres comportamientos. Por un lado, se registró, para cada macho, la edad a la que fue observado realizando el comportamiento de llamado por primera vez; y, por otro lado, se calculó para cada grupo de machos y para cada tiempo, la proporción de machos maduros realizando el comportamiento de llamado (índice de llamado) (Figura 1.1). Para estimar el efecto de la EVG sobre la edad de maduración y el índice de llamado, se utilizaron 4 lotes de moscas (grupos de moscas obtenidas a partir de huevos colectados de la colonia del laboratorio el mismo día) cada uno constando de entre 9 y 12 réplicas por tratamiento. Las réplicas de cada tratamiento fueron mantenidas en incubadoras separadas y las incubadoras utilizadas para cada tratamiento se rotaron con cada lote.

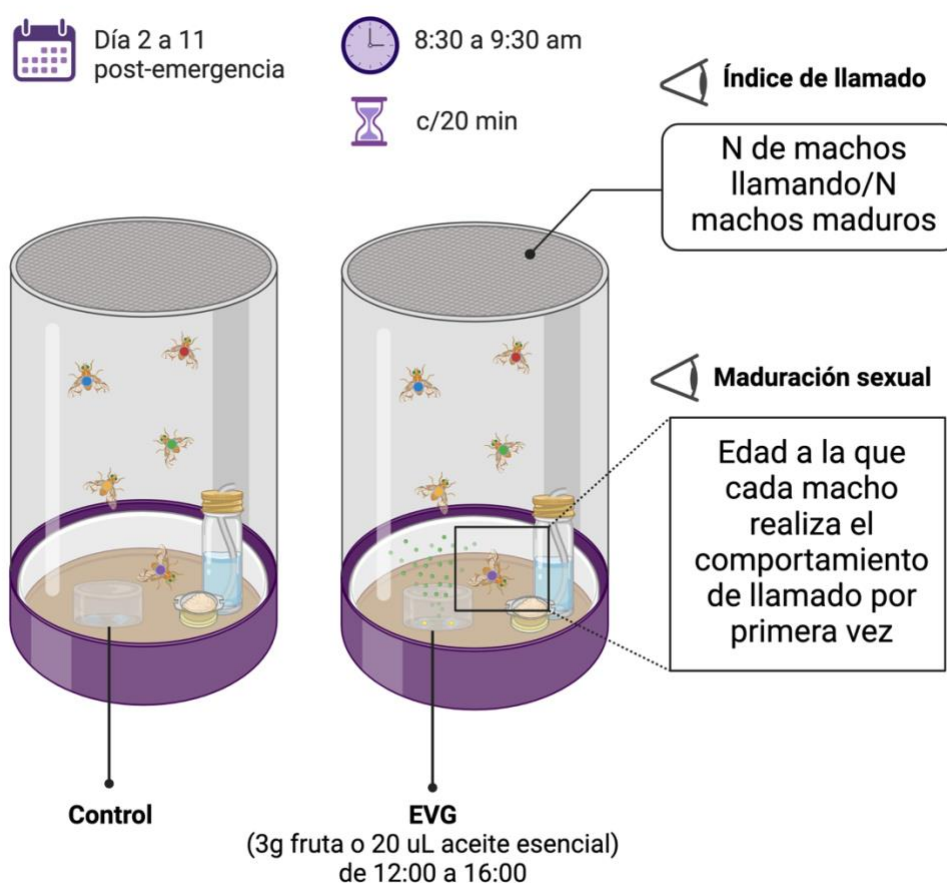


Figura 1.1. Diseño experimental utilizado para estimar el efecto de la EVG sobre la maduración sexual y el índice de llamado.

Dado que, durante este experimento, se encontró un efecto similar para el tratamiento de exposición a FG y AG sobre el comportamiento sexual de los machos, los siguientes experimentos fueron realizados utilizando AG como única fuente de EVG.

Efecto de la EVG sobre la supervivencia en condiciones de hambreado.

Con el objetivo de explorar si la exposición a AG afecta la supervivencia de los machos en condiciones de estrés por inanición, se analizó la resistencia al hambreado luego de 12 días de exposición. Para esto, machos recientemente emergidos fueron separados en grupos de 5 individuos y colocados en frascos de 3 L. Cada grupo fue asignado al azar a uno de dos posibles tratamientos: 1) Exposición a volátiles de guayaba (EVG) o 2) Sin exposición (control). Los grupos de cada tratamiento fueron mantenidos dentro de incubadoras (Sanyo MLR350, Japón) a 25 ± 1 °C y un fotoperíodo de 12 h luz :12 h oscuridad. La EVG fue realizada durante 12 días utilizando AG tal como se describió para el experimento de maduración y llamado (pág. 29). Durante ese período, los machos fueron alimentados *ad libitum* [con una mezcla de azúcar y levadura de cerveza (3:1)] y provistos con agua. Una vez finalizada la fase de exposición, a partir del día 13 post-emergencia (8:30 am), el alimento fue retirado dejando a los machos provistos solo con agua. A partir de este momento, la supervivencia de los machos fue registrada cada 24 h hasta que todos los individuos murieron. Se utilizaron 3 lotes de moscas, cada uno constando de entre 7 y 9 réplicas por tratamiento. Las réplicas de cada tratamiento fueron mantenidas en incubadoras separadas y las incubadoras utilizadas para cada tratamiento se rotaron con cada lote.

Rango etario oportuno para realizar el tratamiento de EVG

Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el experimento de maduración y llamado (pág. 27), machos recientemente emergidos fueron transferidos, en grupos de 5 individuos, a frascos de vidrio de 3 L provistos con agua y alimento (azúcar y levadura de cerveza, 3:1). Cada grupo fue asignado al azar a uno de dos posibles tratamientos: 1) Exposición a volátiles de guayaba (EVG) o 2) Sin exposición (control). La exposición se llevó a cabo con AG como se describe en la página 27, con la diferencia de que en este caso el tratamiento de exposición se realizó durante 4 días en uno de dos posibles rangos etarios. Mientras que en un primer experimento los machos del grupo EVG fueron expuestos a edades tempranas (entre 1 y 4 días post-emergencia, es decir, antes de alcanzar la madurez sexual), en un segundo experimento los machos EVG fueron expuestos a edades tardías (entre los 8 y 11 días post-emergencia, es decir, cuando se encuentran maduros sexualmente). En ambos casos, el índice de llamado de machos adultos fue registrado a los 10, 11 y 12 días post-emergencia. Para cada rango etario, se realizaron entre 27 y 36 réplicas por tratamiento repartidas en 3 lotes de moscas. Todas las réplicas fueron mantenidas en incubadoras a 25 ± 1 °C con un fotoperíodo de 12:12h (luz:oscuridad). Las incubadoras utilizadas para cada tratamiento se rotaron con cada lote.

Análisis de Datos

Todos los análisis estadísticos fueron ejecutados en R (v3.6.2) (R Core Team 2019). Para estimar el efecto de la EVG sobre la edad a la cual los machos alcanzan su madurez sexual, se realizó un modelo lineal generalizado (MLG) [función *lmer* del paquete *lme4* (Bates et al., 2015)] para cada variante de exposición (FG y AG). La significancia fue evaluada usando la función *anova* del paquete *lmerTest* (Kuznetsova et al., 2017). La variable respuesta fue

calculada como el promedio de la edad de maduración por cada grupo de machos (réplica) y el tratamiento (EVG o control) fue incorporado al modelo como un factor fijo de dos niveles. El efecto de los lotes fue incorporado al modelo como un factor aleatorio. Los supuestos de homocedasticidad y normalidad residual fueron testeados con las funciones *levene.Test* [del paquete *car* (Fox y Weisberg, 2018)] y *shapiro.test* [del paquete *stats* (R Core Team, 2019)], respectivamente. Para estimar los efectos de la EVG y la edad sobre la actividad de llamado, para cada variante de exposición (FG y AG para el primer experimento; o exposición temprana y exposición tardía, para el último experimento), se realizó un MLG con distribución binomial [usando la función link *logit*, la función *glmer* del paquete *lme4* (Bates et al. 2015)]. Medidas repetidas del índice de llamado (número de machos llamando/total de machos maduros en el frasco) fueron modeladas como una función del tratamiento. La edad fue incluida como un factor fijo dentro de la réplica, mientras que la réplica y el lote fueron tratadas como factores aleatorios. Para el caso del efecto de EVG sobre la actividad de llamado en el primer experimento, la edad fue considerada como una variable categórica y dado que la mayoría de los machos eran sexualmente inmaduros antes de los 7 días de edad, las edades menores a 7 días fueron excluidas del análisis. En el caso del efecto de la EVG sobre la actividad de llamado en el último experimento, la interacción entre el tratamiento y la edad fue excluida de los modelos de acuerdo al criterio de información de Akaike, el cual fue evaluado usando la función *drop1* del paquete *stats* (R Core Team 2019). Todas las comparaciones fueron hechas usando la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth, 2020).

El efecto de la exposición sobre la supervivencia de los machos en condiciones de hambreado fue estimado mediante un modelo de riesgos proporcionales Cox [usando la función *coxme* del paquete *survival* (Therneau y Grambsch, 2000)]. El tratamiento de exposición fue incluido como un factor fijo, mientras que el lote fue incluido como un factor aleatorio. Por último, se

testeo el supuesto de riesgos proporcionales usando la función *cox.zph* del paquete *survival* (Therneau y Grambsch, 2000).

Resultados

Efecto de la EVG sobre la maduración sexual y el índice de llamado.

Los machos EVG alcanzaron la madurez sexual a edades similares que los machos no expuestos. Cuando el experimento se realizó utilizando FG, los machos EVG maduraron entre los 5,1 y 7,5 días después de su emergencia, mientras que los machos no expuestos maduraron entre los 4,9 y los 7,2 días post emergencia. De manera similar, cuando el experimento se realizó con AG los machos expuestos maduraron entre los 5,2 y los 7,8 días, mientras que los machos no expuestos maduraron entre los 5,4 y los 8 días post emergencia. De acuerdo con el análisis, ni la exposición a FG ($F_{1,60} = 3,51$; $p = 0,066$) ni la exposición a AG ($F_{1,73} = 2,96$; $p = 0,089$) afectaron la edad de maduración sexual de los machos (Figura 1.2A, 1.2C). Tanto la exposición a FG ($\text{ChiSq}_1 = 15,90$; $p < 0,0001$) como la exposición a AG ($\text{ChiSq}_1 = 8,10$; $p = 0,004$) afectaron el índice de llamado de los machos. El *odds* del índice de llamado (probabilidad de llamar/probabilidad de no llamar) fue en promedio 0,6 ($p = 0,0008$), 0,7 ($p = 0,0002$), 0,4 ($p = 0,0153$) y 0,75 ($p < 0,0001$) veces mayor para machos expuestos a FG que para machos control a los 8, 9, 10 y 12 días post-emergencia, respectivamente (Fig. 1.2B). Cuando la exposición fue realizada con AG, el *odds* del índice de llamado fue en promedio 0,4 ($p = 0,0440$), 0,7 ($p = 0,0049$), 1,1 ($p = 0,0002$) y 1,6 ($p < 0,0001$) veces mayor para machos expuestos que para machos control a los 9, 10, 11 y 12 días, respectivamente (Fig. 1.2D).

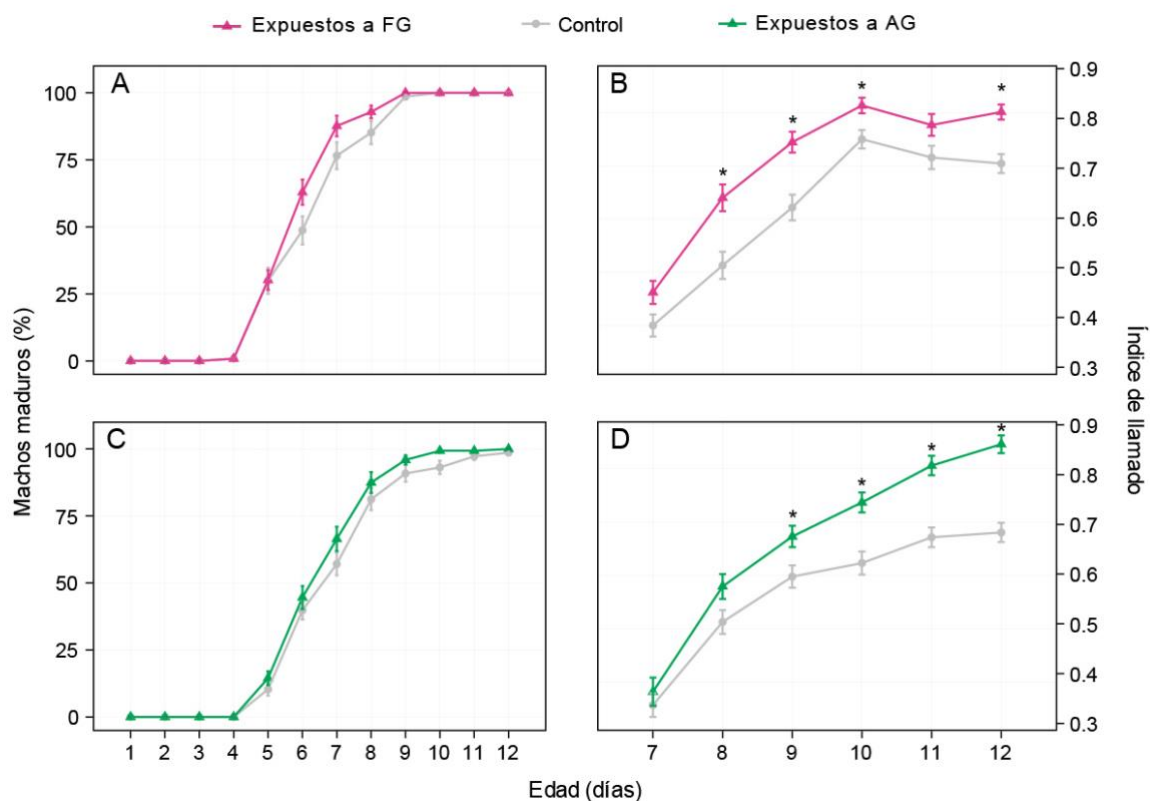


Figura I.2. Efecto de la exposición a volátiles de guayaba (EVG) sobre la maduración sexual y la actividad de llamado de machos de *Anastrepha fraterculus*. La figura muestra el porcentaje promedio de machos maduros desde el día 1 hasta el día 12 post-emergencia de los adultos (A y C) para machos EVG [expuestos a frutos de guayaba (FG) -magenta- o expuestos a aceite esencial de guayaba (AG) -verde-] o no expuestos (Control -gris-). Además, para cada tratamiento se muestra el índice de llamado promedio (B y D) desde el día 7 al día 12 post-emergencia. Las barras representan el error estándar y los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Efecto de la EVG sobre la supervivencia en condiciones de hambre

La exposición de los machos a compuestos volátiles de AG durante 11 días no afectó la probabilidad de supervivencia de los machos en condiciones de hambre ($Z = 1,76$; $p = 0,079$) (Figura I.3).

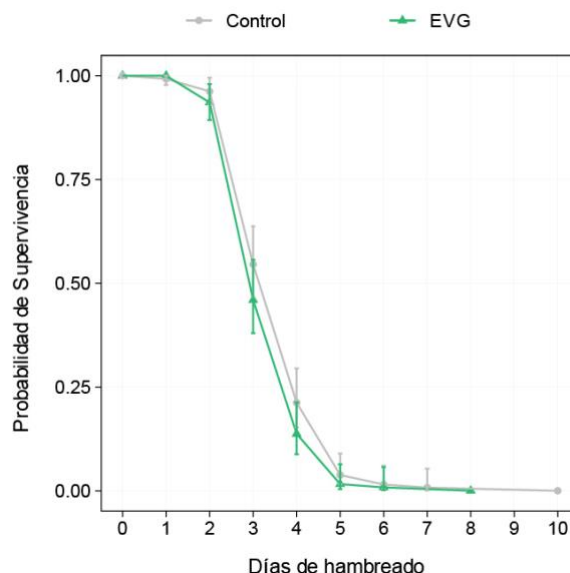


Figura I.3. Supervivencia de los machos de *Anastrepha fraterculus* en condiciones de hambreado luego de un tratamiento de EVG. La figura muestra la probabilidad de supervivencia de los machos EVG (verde) y no expuestos (gris) luego de ser alimentados con una mezcla de azúcar y levadura de cerveza (3:1) durante 11 días desde su emergencia.

Rango etario oportuno para realizar el tratamiento de EVG

El tratamiento temprano de EVG (es decir, antes de alcanzar la madurez sexual), no afectó el comportamiento de llamado de los machos entre los 10 y los 12 días de edad ($Z = 1,470$; $p = 0,142$). Por el contrario, el tratamiento tardío de EVG (es decir, luego de alcanzar la madurez sexual), aumentó en promedio 1,79 veces el *odds* del índice de llamado de los machos EVG respecto al de los machos control ($Z = 6,32$; $p < 0,0001$). Tanto para la EVG temprana como para la EVG tardía, el índice de llamado aumentó con la edad ($\text{ChiSq}_1 = 25,41$; $p < 0,0001$ y $\text{ChiSq}_1 = 12,54$; $p = 0,0004$, respectivamente) (Figura I.4).

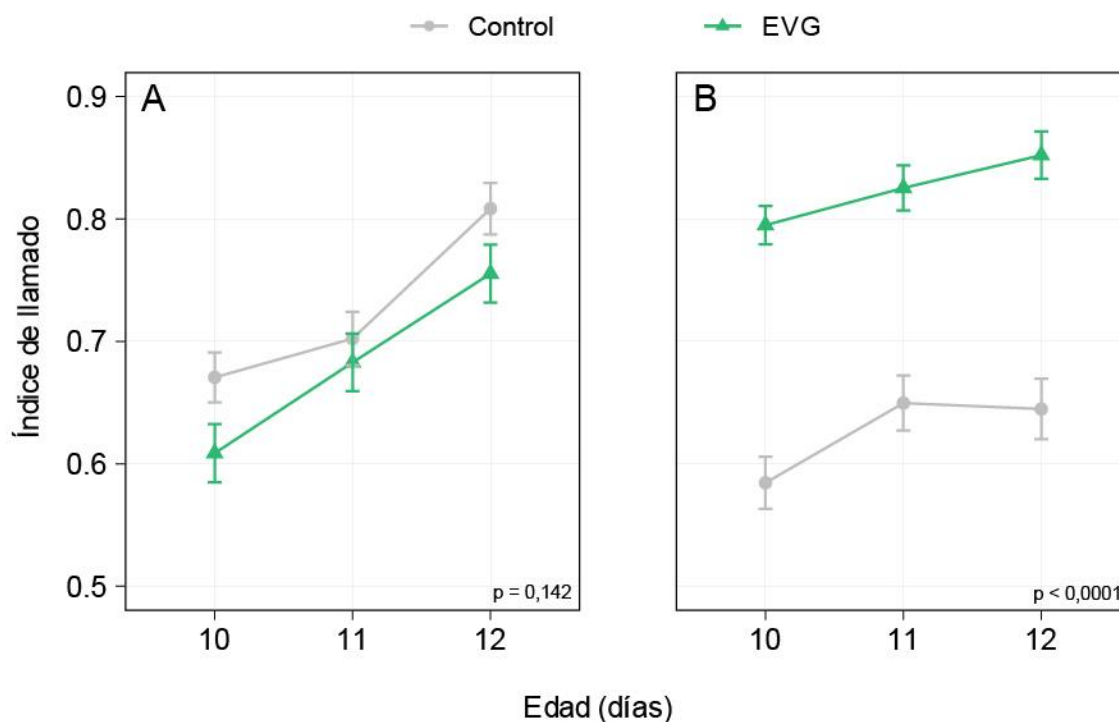


Fig.1.4. Momento oportuno para realizar un tratamiento de EVG para estimular el comportamiento sexual de *Anastrepha fraterculus*. La figura muestra el efecto de la EVG sobre el índice de llamado (números de machos llamando/número de machos totales) de los machos para dos tipos de exposición (A: exposición temprana, entre 1-4 días post emergencia; B: exposición tardía, entre los 8-11 días post emergencia). Los círculos y triángulos indican el índice de llamado promedio para los machos expuestos (verde) y no expuestos (gris) a los 10, 11 y 12 días desde su emergencia mientras que las barras representan el error estándar. La significancia del efecto del tratamiento está indicada con el p valor (MLG y Prueba de Tukey).

Discusión

En este capítulo se exploró el efecto de la exposición a volátiles de guayaba sobre el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus* desde una perspectiva aplicada. Primeramente, se evaluó un aceite comercial de guayaba como una fuente de volátiles alternativa a la fruta. Al igual que los frutos de guayaba (Bachmann et al., 2015), la exposición al aceite estimuló el comportamiento sexual de los machos. Sin embargo, no se encontró evidencia de que este tratamiento (o la exposición con frutos) acelere su maduración sexual. Por otro lado, un tratamiento prolongado de EVG no parece afectar la supervivencia de los machos cuando son sometidos a condiciones de estrés por hambre. Por último, se

encontró que el efecto estimulador de EVG sobre la actividad sexual de los machos depende en gran medida de la edad a la que los machos son expuestos.

Concordantemente con los estudios realizados por Bachmann y colaboradores en 2015, el primer experimento mostró que la exposición a FG aumenta la actividad de llamado de los machos (Bachmann et al., 2015). Los mismos autores probaron, además, que la exposición de los machos a una mezcla de siete compuestos sintéticos (elegidos por ser representativos de los volátiles de guayaba en la bibliografía) también estimulaba el éxito de apareamiento de los machos. Sin embargo, el efecto de esta mezcla fue menor que el efecto de la exposición a los frutos, indicando que podría haber otros compuestos involucrados en la respuesta. En este trabajo, el efecto de la EVG sobre el comportamiento sexual fue similar para ambas fuentes de volátiles utilizadas (FG o AG) sugiriendo que los compuestos responsables de estimular el comportamiento de llamado de los machos están presentes tanto en la fruta como en el aceite. La utilización de un aceite esencial comercial como fuente de volátiles podría facilitar la implementación de este tratamiento en un programa de control por TIE empleando un sistema similar al que se utiliza para dispensar GRO en crías masivas de *C. capitata* (Shelly, 2006; Pereira et al., 2013).

Los resultados mostraron que los machos comienzan a realizar actividades de llamado, en promedio, alrededor de los 6 días post-emergencia, tal como fue informado previamente para esta especie por Segura y colaboradores (Segura et al., 2013). En este estudio, no se encontró evidencia de maduración anticipada para los machos EVG. Sin embargo, este es el primer intento de explorar, en *Anastrepha*, los efectos de la EVG sobre la maduración sexual de los machos. Estudios previos mostraron que la maduración sexual en varias especies de moscas de la fruta está modulada por la cantidad y el tipo de proteína adquirida durante la etapa adulta (Pereira et al., 2009; Haq et al., 2010; Liendo et al., 2013). Por lo tanto, se requerirán

ensayos adicionales con diferentes condiciones nutricionales para llegar a resultados concluyentes. Además, podrían también incluirse otros estimadores de madurez sexual, como el tamaño de los órganos reproductivos o los niveles circundantes de ciertas hormonas (Aráujo et al., 2020; Southon et al., 2020). Esto podría ayudar a evaluar con mayor precisión el estado madurativo de los machos y por lo tanto el efecto de la EVG sobre el mismo.

Como se mencionó anteriormente, en un contexto de TIE, los machos liberados deben sobrevivir (en un ambiente comparativamente hostil en relación al cual fueron criados) hasta aparearse con hembras silvestres (Knipling, 1955). Por lo tanto, es importante examinar si algún tratamiento previsto para una etapa de pre-liberación de los machos reduce su supervivencia en condiciones de estrés (Levy et al., 2005). El presente estudio reveló que, incluso después de una exposición prolongada a volátiles de AG, la supervivencia de los machos de *A. fraterculus* en condiciones de hambreado no se ve afectada. Resultados similares fueron encontrados cuando se evaluó el efecto de la exposición volátiles de GRO sobre la supervivencia de machos de *C. capitata* (Andrés et al., 2009; Juan-Blasco et al., 2013; Paranhos et al., 2013). Sin embargo, el estado nutricional de los machos tefrítidos puede afectar fuertemente su capacidad para resistir condiciones de hambreado (Levy et al., 2005; Taylor et al., 2013; Utgés et al., 2013). Por esto, las conclusiones de este estudio posiblemente estén restringidas a la dieta utilizada para alimentar a los machos (azúcar:levadura de cerveza, 3:1).

Durante el ensayo realizado para evaluar el efecto de la EVG sobre la maduración y el comportamiento de llamado, los machos estuvieron expuestos a los volátiles de guayaba desde el primer día después de su emergencia. Sin embargo, el incremento del índice de llamado provocado por la EVG no se observó hasta que los machos tuvieron entre ocho y nueve días de edad (dependiendo de la fuente: AG o FG). Sobre esta observación se cuestionó

si la exposición temprana (antes de los 8 días post-emergencia) a volátiles de guayaba contribuye al efecto observado sobre el comportamiento sexual. Los resultados aquí presentados muestran que el efecto estimulador de la EVG sobre comportamiento sexual depende del rango etario en el que los machos son expuestos. Teniendo en cuenta que en esta especie los machos alcanzan la madurez sexual justo antes del octavo día, estimular su comportamiento sexual mediante un tratamiento de EVG parecería factible solo si la exposición se realiza sobre machos maduros. Los machos de *C. capitata* pueden ser estimulados por la exposición a GRO incluso cuando son expuestos únicamente a edades previas a su madurez sexual (Shelly, 2001a; Shelly y McInnis, 2001). En contraste, la exposición a AG no incrementó la actividad de llamado de los machos de *A. fraterculus* cuando fueron expuestos antes de haber alcanzado la madurez sexual. Sin embargo, el diseño experimental implementado en este trabajo no permite reconocer si la falta de efecto de la exposición a edades tempranas sobre el comportamiento de llamado es, en realidad, un producto de la ventana temporal más amplia (respecto a la exposición a edades maduras) entre la exposición temprana y las observaciones del comportamiento. Estudios futuros que aborden la duración del efecto de la exposición podrían arrojar luz sobre esta cuestión.

En las especies del género *Anastrepha* actualmente controladas por la TIE, los machos son liberados justo después de alcanzar la madurez sexual (Orozco-Dávila et al., 2017). Según los resultados presentados en este trabajo, estimular el comportamiento sexual en machos de *A. fraterculus* usando AG requeriría mantener a los insectos al menos dos días desde su madurez sexual, lo que aumentaría los costos de mantenimiento. Por otro lado, estudios previos, mostraron que los machos de *A. fraterculus* tratados con metopreno, un análogo de la hormona juvenil, maduran entre 2 y 3 días antes que los machos no tratados (Liendo et al.,

2013). Por lo tanto, estudios que combinen el tratamiento de metopreno con EVG podrían incorporar resultados que ayuden a desarrollar estrategias de liberación factibles y eficientes. En resumen, la EVG podría utilizarse para estimular el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus*, sin afectar su supervivencia en condiciones de estrés. Aunque el tratamiento de EVG no parece acelerar la maduración sexual de los machos, se necesitan más estudios para descartar esta hipótesis. La factibilidad de implementar un tratamiento de EVG en el marco de un programa TIE para el control poblacional de *A. fraterculus* dependerá en gran medida de la relación costo-beneficio del mantenimiento de los machos hasta su madurez sexual. Por último, cabe destacar que los resultados aquí presentados fueron obtenidos a partir del tratamiento de machos no irradiados (método utilizado para esterilizar moscas de la fruta). Por esto, estudios futuros deberían validar estos hallazgos en machos estériles criados bajo un protocolo de control por TIE, el cual aún no se encuentra completamente desarrollado para esta especie.

Capítulo II

Estimulación sexual por EVG: Cambios en la expresión génica de la cabeza de los machos



Introducción

Los insectos presentan una gran variedad de estrategias de cortejo basadas principalmente en respuestas estereotipadas innatas que responden a diversos estímulos externos (Manoli et al., 2006; Rings y Goodwin, 2019). Las principales plagas de moscas de los frutos (Familia Tephritidae) presentan un sistema de apareamiento en lek, es decir que los machos se agrupan con el propósito de aparearse (Aluja y Norrbom, 1999; Díaz-Fleischer y Aluja, 1999; Sivinski et al., 1999). En el lek, los machos atraen y cortejan a las hembras realizando una serie de movimientos estereotipados (comúnmente conocido como “llamado”) que implican un rápido batido de las alas, la extrusión de las glándulas salivales y el tejido anal, y la liberación de feromonas sexuales (Nation, 1972; Aluja et al., 1993; Kaspi y Yuval, 1999; Field et al., 2002; Segura et al., 2007; Gomez Cendra et al., 2011; Passos Roriz et al., 2018). Generalmente, la frecuencia con la que los machos realizan este comportamiento está positivamente asociada con su éxito de apareamiento (Whittier et al., 1994; Boake et al., 1996; Shelly, 2018). Para varias especies de moscas de los frutos, la exposición de machos a ciertos fitoquímicos (los compuestos dependen de la especie) resultó un tratamiento exitoso para incrementar su éxito copulatorio (Segura et al., 2018). En machos de *A. fraterculus* y *C. capitata* el aumento del éxito de apareamiento tras la exposición a fitoquímicos (FG y GRO, respectivamente) es precedido por un incremento en la frecuencia de llamado y la cantidad de feromona liberada por los machos durante el cortejo (Segura et al., 2018). Tal como sucede en muchas especies de insectos (Landolt y Phillips, 1997), la percepción de ciertas claves olfativas podría estar desencadenando en los machos de *A. fraterculus* la síntesis de feromonas y la estimulación del comportamiento sexual. Hasta ahora, el fenómeno de estimulación sexual de machos tefrítidos mediante la exposición a fitoquímicos ha sido mayormente estudiado desde una

perspectiva aplicada al manejo poblacional de plagas. Por esto, los mecanismos genéticos y fisiológicos subyacentes a dicho fenómeno permanecen poco comprendidos.

En la especie modelo *Drosophila melanogaster*, el comportamiento sexual de los machos se encuentra regulado por un *cluster* de neuronas (P1) que co-expresan *doublesex* (Dsx^M) y *fruitless* (Fru^M), dos factores de transcripción de la cascada de determinación del sexo (Manoli et al., 2006; Kimura et al., 2008; Yamamoto, 2008). Las neuronas de P1 extienden sus dendritas hasta el protocerebro lateral (LH, del inglés *lateral horn*), un centro de procesamiento superior que modula las respuestas comportamentales a partir de información sensorial, principalmente olfativa (Yamamoto, 2008; Clowney et al., 2015; Schultzhaus et al., 2017). Además, la actividad de P1 puede ser modulada por señales internas indicadoras del grado de hambre o el estado de apareamiento de los insectos (Ellendersen y von Philipsborn, 2017; Cheriyaunkunel et al., 2021). En particular, el gen Fru^M codifica las proteínas reguladoras de la transcripción que constituyen el factor de control más importante en la diferenciación del comportamiento sexual masculino (Ito et al., 1996; Ryner et al., 1996; Baker et al., 2001). Fru^M se expresa tanto en neuronas del sistema nervioso central (SNC) como en neuronas sensoriales del sistema nervioso periférico (SNP), lo que sugiere que la información sensorial modula el comportamiento sexual (Billeter y Goodwin, 2004; Manoli et al., 2005). Cuando Manoli y colaboradores silenciaron el gen Fru^M en la totalidad del SN de *D. melanogaster*, el comportamiento de cortejo fue suprimido. Por otro lado, al silenciar el mismo gen, pero únicamente en neuronas olfativas, se observó una disminución de la capacidad de los machos para modular el comportamiento sexual en presencia de conoespecíficos (Manoli et al., 2005). Estos resultados sugirieron que la expresión de Fru^M es necesaria para activar y regular el comportamiento de cortejo de los machos de *D. melanogaster*. El descubrimiento de características compartidas (e.g., el *splicing* alternativo

sexo-específico y la expresión en el tejido nervioso) entre los genes homólogos de *Fru^M* en varias especies de insectos permitió proponer su conservación funcional (Gailey et al., 2006; Salvemini et al., 2010). En la mosca de los frutos *C. capitata*, la expresión del homólogo *Cc Fru^M* fue encontrada solo en la cabeza de los machos. Además, pseudo-machos XX¹⁰ de esta especie, también expresan *Cc Fru^M* sugiriendo su rol en la regulación del comportamiento de cortejo masculino (Salvemini et al., 2010). En *B. dorsalis*, los niveles de expresión de *Bd Fru^M* a nivel ARN en la cabeza de los machos aumenta después del apareamiento. Además, el éxito copulatorio de machos tratados con ARN de interferencia (ARNi) para este gen disminuyó entre un 17 % y un 22 %, aunque el comportamiento de cortejo de los machos silenciados presentó mayor duración (Chen et al., 2020b). La participación de *Fru^M* en el comportamiento sexual también fue confirmada en *A. fraterculus* (Teixeira, 2018). El silenciamiento de *Af Fru^M* mediante ARNi provocó una disminución del índice de llamado sin alterar otras actividades realizadas por los machos, como la búsqueda de alimento, el desplazamiento o la producción de espermatozoides (Teixeira, 2018).

Por lo mencionado anteriormente, *Fru^M* es un buen candidato como mediador de la estimulación sexual causada por la exposición a fitoquímicos en moscas tefritidas. Sin embargo, otros genes también podrían estar implicados. Kumaran y colaboradores estudiaron mediante la secuenciación masiva de ARN mensajero (ARNseq) los cambios en la expresión génica de machos de *B. tryoni* tras ser alimentados con zingerone, un fitoquímico conocido por incrementar el éxito copulatorio de esta especie (Kumaran et al., 2014). Este estudio reveló que los machos alimentados con zingerone sobre-expresan, entre otros genes, un gen de la familia *takeout* (Kumaran et al., 2014). *Takeout*, se expresa predominantemente

¹⁰ pseudo machos XX: son producto de la interferencia transitoria (mediante tratamiento con ARNi) de la expresión del gen *transformer* en embriones XX. Esta interferencia puede causar una transformación sexual completa, lo que da como resultado un fenotipo XX masculino fértil.

en el cuerpo graso de machos y es conocido por participar en el control del comportamiento de cortejo (Vanaphan et al., 2012; Scannapieco et al., 2020). Además, en *D. melanogaster*, *takeout* se encuentra regulado por *Dsx^M* y *Fru^M* (Dauwalder et al., 2002). Por otro lado, Kumaran y colaboradores, mediante un análisis de enriquecimiento funcional basado en términos de ontología génica (GO terms), mostraron que los transcriptos provenientes de machos alimentados con zingerone se encontraban funcionalmente enriquecidos en términos relacionados al metabolismo energético (Kumaran et al., 2014). Cabe destacar que la estimulación sexual desencadenada por zingerone en *B. tryoni* implica el consumo del fitoquímico por parte de los machos. Hasta ahora, este tipo de estudios no ha sido realizado sobre machos tefrítidos que fueron estimulados sexualmente por la sola exposición a compuestos volátiles, como es el caso de *A. fraterculus* o *C. capitata*.

El objetivo de este capítulo fue realizar una primera aproximación al estudio de las bases genéticas de la estimulación sexual de *A. fraterculus* tras la EVG mediante el estudio transcriptómico de la expresión génica diferencial entre machos EVG y machos control. Para esto, se focalizó en los transcriptos de la cabeza de los machos, incluyendo así tanto al sistema nervioso central como una parte del cuerpo graso.

Materiales y Métodos

Insectos, comportamiento de llamado y obtención de muestras

Siguiendo la metodología descrita en el capítulo I para la exposición tardía, 12 grupos de 5 machos fueron asignados al tratamiento de EVG y otros 12 grupos, al tratamiento control (no expuestos). La exposición de machos a volátiles de AG fue realizada durante 4 horas (12:00 a 16:00 h) cada día desde el día 8 hasta el día 11 post-emergencia.

Para confirmar el efecto estimulante de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos previo a la extracción de ARN, se registró el comportamiento de llamado los días 10 y 11 post-emergencia siguiendo la metodología descrita en el capítulo I. Para esto, se registró, para cada grupo de machos (réplica), la proporción de machos llamando (el índice de llamado) una vez cada 20 minutos durante la primera hora de luz (8:30 a 9:30 h). Luego de confirmar el efecto estimulador de la EVG, entre las 8:30 y las 9:30 del día 12 post-emergencia, 5 grupos de 10 cabezas de machos (para cada tratamiento) fueron disecadas con pinzas entomológicas e inmediatamente sumergidas y homogeneizadas en 800 μ L de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) frío (5-8 °C).

Extracción de ARN, preparación de bibliotecas de ADNc y secuenciación

Cada homogenato fue centrifugado a 15.000 *g* por 1.5 minutos y 350 μ L del sobrenadante fueron transferidos a un tubo Eppendorf para la purificación del ARN usando columnas de sílice. El ARN total de cada muestra se aisló según las especificaciones del fabricante, utilizando el Kit de extracción de ARN Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). Así, a partir de cada homogenato, se obtuvieron 40 μ L de solución acuosa de ARN. La integridad y la pureza de cada muestra de ARN fueron determinadas mediante electroforesis en gel de agarosa (1 % m/v) y espectrofotometría en Nanaodrop (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. Todas las muestras de ARN fueron almacenadas a -70 °C hasta su envío a los laboratorios de Novogene en EEUU, donde se realizaron —como servicio— la preparación de las bibliotecas de ADN complementario (ADNc) y su posterior secuenciación (RNAseq). Durante la preparación de las bibliotecas, las muestras fueron enriquecidas en ARN mensajero (ARNm) utilizando perlas de oligo dT y eliminando el ARN ribosomal (ARNr) mediante un kit Ribo-Zero™. La secuenciación de las bibliotecas fue realizada en un equipo

NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, EEUU) que generó aproximadamente 6 Gb en lecturas emparejadas de 150 pb (PE 150) por muestra.

Control de calidad, ensamblado de novo y anotación del transcriptoma

Las secuencias de los adaptadores (TruSeq3-PE) y las lecturas de baja calidad ($Q < 30$) o muy cortas (< 36 b) fueron descartadas usando el programa Trimmomatic v 0.32 (Bolger et al., 2014). La calidad de las lecturas generadas por la secuenciación fue analizada y visualizada, antes y después del filtrado, usando los programas FastQC v 0.11.9 (Andrews, 2010) y MultiQC v 1.14 (Ewels et al., 2016).

Dado que aún no existe un genoma de referencia para *A. fraterculus*, las lecturas resultantes de todas las muestras fueron ensambladas *de novo* para generar un transcriptoma de referencia. El transcriptoma de referencia fue generado utilizando el programa Trinity v2.13.2 (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013). Para evaluar la calidad del ensamblado, se calculó el valor del N50 (la longitud mínima de *contig* que representa a la mitad de las bases ensambladas) y se examinó el porcentaje de representación de las lecturas en el ensamblado mediante el programa Bowtie2 v 2.5.0 (Langmead et al., 2009). Además, se estimó la completitud del ensamblado mediante la búsqueda de genes de dípteros ortólogos de copia única usando el programa BUSCO v 4.1.2 (Manni et al., 2021). Los parámetros utilizados en cada uno de los programas mencionados que no fueron configurados por defecto se muestran en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Programas y parámetros utilizados para el filtrado, control de calidad y ensamblado *de novo* del transcriptoma de *Anastrepha fraterculus* generado a partir de lecturas obtenidas de cabezas de machos EVG y no expuestos.

Programa	Versión	Parámetros utilizados
Bowtie2	2.5.0	--no-unal -p 10
BUSCO	4.1.2	--mode transcriptome -l diptera_odb10
FastQC	0.11.9	por defecto
MultQC	1.14	por defecto
Trimomatic	0.11.9	ILLUMINACLIP:/TruSeq3-PE LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:36
Trinity	2.13.2	--max_memory 240G --CPU 20

Para realizar la anotación funcional de los genes se siguió el protocolo recomendado por Trinotate v 3.2.2 (Bryant et al., 2017), diseñado para la anotación de transcriptomas ensamblados *de novo*. Trinotate integra la información obtenida a partir de: 1) búsquedas de similitud entre las secuencias ensambladas (transcriptos o proteínas predichas) con secuencias disponibles en bases de datos (Swissprot, Pfam, NCBI), y 2) predicciones de ciertas características de los transcriptos o proteínas predichas (la presencia de un péptido señal, dominios transmembrana, etc.), para luego buscar los términos de ontología génica (GO por sus siglas en inglés) asociados a cada transcripto caracterizado. Para esto, las secuencias proteicas de los transcriptos ensamblados fueron predichas con el programa TransDecoder v 5.5.0 (github.com/TransDecoder). Luego, las secuencias de las proteínas predichas fueron utilizadas como *input* en distintos programas que permiten reconocer secuencias o motivos proteicos conocidos. Así, usando BLAST v 2.13.0 (Madden, 2002), se realizaron búsquedas de similitud contra bases de datos (no redundantes) de proteínas (Swissprot y NCBI dípteros). También se identificaron dominios proteicos mediante el programa HMMER v 3.3.2 (hmmerr.org) y se realizaron predicciones de secuencias de péptido señal con signalP v 5.0 (Almagro Armenteros et al., 2019) y de dominios transmembrana con TMHMM v 2.0 (Krogh et al., 2001). Además, se predijeron —a partir de los transcriptos ensamblados— secuencias

típicas de ARNr usando RNAmmer v2.1 (Krogh et al., 2001). Los parámetros no utilizados por defecto en cada programa durante la anotación funcional se muestran en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Programas y parámetros utilizados para la anotación funcional del transcriptoma *de novo* de *Anastrepha fraterculus* generado a partir de lecturas obtenidas de cabezas de machos EVG y no expuestos.

Programa	Versión	Parámetros utilizados
BLAST (BLASTx y BLASTp)	2.13.0	Base de datos: Swissprot y NCBI diptera; -max_target_seqs 1 -outfmt 6 -num_threads 10 -evaluate 1e-3
HMMER	3.3.2	Base de datos: Pfam ; --cpu 8
RNAmmer	1.2	-org_type uk
signalP	4.0	-batch 20000 -org euk
TMHMM	2.0	Por defecto
TransDecoder	5.5.0	-m 50
Trinotate	3.2.2	Por defecto

Reducción de redundancia, cuantificación y análisis de expresión diferencial

Dado que el número de genes del transcriptoma ensamblado estuvo muy por encima de lo esperado (el número de genes del transcriptoma ensamblado fue 228.988, mientras que el número de genes para *C. capitata*, *D. melanogaster* y *A. aegypti* fue 14.232, 17.894 y 19.623 respectivamente, de los cuales 12.563, 13.962 y 14.626 codifican proteínas), se siguieron las recomendaciones de Kerkvliet y colaboradores para reducir la redundancia del ensamblado (Kerkvliet et al., 2019). Para esto, los transcriptos con baja abundancia de lecturas (<1tpm) fueron descartados y el ensamblado remanente fue reorganizado en clústeres usando el programa CD-HIT-EST v 4.8.1 (Limin et al., 2012).

La abundancia de los transcriptos fue cuantificada mediante la pseudoalineación de las lecturas resultantes de la secuenciación con el transcriptoma ensamblado usando el programa kallisto v 0.46.1 (Bray et al., 2016). Para estudiar si el tratamiento de EVG afecta la expresión génica de los machos de *A. fraterculus*, se comparó la abundancia a nivel de gen de las lecturas provenientes de muestras de machos EVG y de machos no expuestos. Para esto,

se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando el paquete DESeq2 v 4.2 (Love et al. 2014). Además, utilizando el programa GOseq v 3.16 (Young et al., 2010), se analizó la existencia de posibles funciones moleculares y procesos biológicos (términos GO) sobre-representados en el conjunto de GDE respecto al conjunto total de genes del ensamblado. Por último, los genes diferencialmente expresados (GDE) que tenían al menos una proteína predicha se alinearon usando BLASTp contra una base de datos no redundante de proteínas de organismos eucariotas con el programa Blast2go v 5.2 (Conesa y Götz, 2008). Los parámetros utilizados en cada programa se muestran en la Tabla II.3.

Tabla II.3. Programas y parámetros utilizados para la reducción de redundancia del transcriptoma ensamblado *de novo* de *Anastrepha fraterculus*, la cuantificación de lecturas obtenidas de cabezas de machos EVG y no expuestos y el análisis de expresión diferencial.

Programa	Versión	Parámetros utilizados
Kallisto	0.46.1	Por defecto
CD-HIT-EST	4.8.1	-c 0.95 -G 1 -n 11 -d 0
DESeq2	4.2	-P 0.01 -C 2
GOseq	3.16	-P 0.01
Blast2go	Blastx (E-value: $1.0e^{-3}$, DB: nr, Taxonomy:euk, Máx. hits: 20, Word size: 3, HSP Length Cutoff: 33)	

Resultados

Comportamiento de llamado

Confirmando el efecto estimulador de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos, el *odds* del índice de llamado de los machos expuestos fue en promedio 1,72 veces mayor que el de los machos control ($Z_{\text{ratio}} = 2,92$; $p = 0,003$). Además, también en concordancia con los resultados obtenidos en el capítulo I, el índice de llamado aumentó con la edad de los machos ($\text{Chisq} = 9,99$; $p = 0,002$) independientemente del tratamiento (Figura II.1).

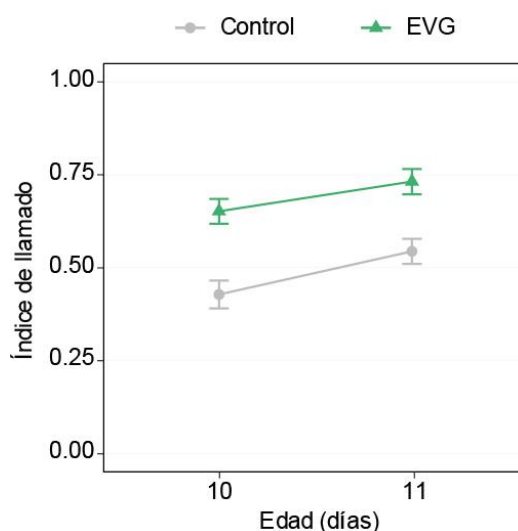


Figura II.1. Efecto de la EVG sobre el comportamiento de llamado de *Anastrepha fraterculus*. La figura muestra el índice de llamado (números de machos llamando/número de machos totales) en machos EVG (verde) y en machos no expuestos (gris) a los 10 y 11 días post-emergencia. Los círculos y triángulos indican el índice de llamado promedio, mientras que las barras representan el error estándar.

Secuenciación y ensamblado de novo

A partir de las bibliotecas de ADNc de machos EVG y machos no expuestos, la secuenciación produjo un promedio de 46.290.385 y 45.609.723 lecturas, respectivamente. En promedio el 2,49 % de las lecturas fueron descartadas por ser muy cortas o de baja calidad (Tabla II.4).

Tabla II.4. Resumen de resultados de la secuenciación. La tabla muestra los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de bibliotecas de ADNc generadas desde muestras de ARN de cabezas de machos de *Anastrepha fraterculus* expuestos a volátiles de guayaba (EVG) y no expuestos (control).

Tratamiento	Muestra	Lecturas totales	Pares de lecturas	Largo de lectura promedio	GC (%)	Lecturas efectivas (%)
Control	C1	51062518	25531259	149	39,43	97,52
	C2	40001178	20000589	149	39,36	97,18
	C3	43246946	21623473	149	38,68	97,37
	C4	47098456	23549228	149	38,76	97,29
	C5	46639518	23319759	149	39,14	97,91
EVG	E1	44180182	22090091	149	39,48	97,74
	E2	48082112	24041056	149	39,61	97,91
	E3	42767584	21383792	149	39,34	97,29
	E4	48464876	24232438	149	39,26	97,47
	E5	47957172	23978586	149	39,44	97,38

El transcriptoma ensamblado constó de 434.524 transcritos (228.988 genes), de los cuales el 45,09 % de los transcritos (28,4 % de los genes) fueron descartados por presentar valores

de expresión menores a 1 transcripto por millón (1 tpm) según Kallisto v 0.46.1. Después de filtrar por abundancia mínima se realizó un segundo filtro con CDHIT v 4.8.1 para minimizar la redundancia. Este segundo filtro consistió en un proceso de clusterización que resultó en un ensamblado final conformado por 191.556 transcriptos (158.147 genes). Este último ensamblado presentó una completitud estimada del 90,5 % cuando se evaluó la presencia de genes ortólogos de copia única de dípteros según BUSCO v 4.1.2. La Tabla II.5 resume las métricas y los parámetros de calidad del transcriptoma ensamblado para cada paso de filtrado.

Tabla II.5. Resumen de resultados del filtrado y control de calidad del transcriptoma ensamblado *de novo*. La tabla muestra los resultados obtenidos en cada paso (números consecutivos) y programa utilizado para realizar el filtrado (Kallisto, Trinity y CD-HIT) y el control de calidad del transcriptoma ensamblado (bowtie2 y BUSCO).

Transcriptoma ensamblado <i>de novo</i>	
1. Trinity	
Número total de genes	228.988
Número total de transcriptos	434.524
% GC	37,16 %
N50	1329
Longitud media de <i>contig</i>	407
Promedio de <i>contig</i>	786,34
Total de bases ensambladas	341.685.678
Estadísticas basadas sólo en la isoforma más larga por 'gen'	
N50	733
Longitud media de <i>contig</i>	330
Promedio de <i>contig</i>	576,23
Total de bases ensambladas	131.950.202
2. Trinity + Kallisto: Filtrado por nivel de expresión (>1 tpm)	
Número total de genes retenidos	163.945 (71,60 %)
Número de transcriptos retenidos	238.606 (54,91 %)
% GC	37,39 %
N50	1746
Longitud media de <i>contig</i>	356
Promedio de <i>contig</i>	811,4

3. CD-HIT	
Número de genes retenidos	158.147 (96,46 %)
Número de transcriptos retenidos (Clusteres)	191.556 (80,28 %)
% GC	37,23 %
N50	1312
Longitud media de <i>contig</i>	327
Promedio de <i>contig</i>	681,21
Total de bases ensambladas	130.489.498
BUSCO	
BUSCOs	2.975 (90,5 %)
BUSCOs copia única	2.945 (89,6 %)
BUSCOs duplicados	30 (0,9 %)
BUSCOs fragmentados	45 (1,4 %)
BUSCOs perdidos	265 (8,1 %)
BUSCOs desde el dataset diptera_odb10	3285

Anotación, análisis de expresión diferencial y enriquecimiento de términos GO

Del total de transcriptos ensamblados, 4.183 produjeron al menos un Blastx Hit (nucleótidos traducidos en los seis marcos de lectura contra bases de datos de proteínas) contra proteínas de dípteros (NCBI). Esta búsqueda, junto a otras de similitud de secuencias y predicciones de motivos proteicos realizadas con Trinotate, permitieron asignarle a 19.766 transcriptos al menos un término GO.

Del total de los genes predichos, 362 fueron encontrados diferencialmente expresados (FDR < 0,01; |FC| > 2) entre las muestras de cabezas de machos EVG y machos no expuestos (control) (Figura II.2). De estos, 161 genes se encontraron sobre-expresados en machos EVG y 201 en machos control (Tabla II.6).

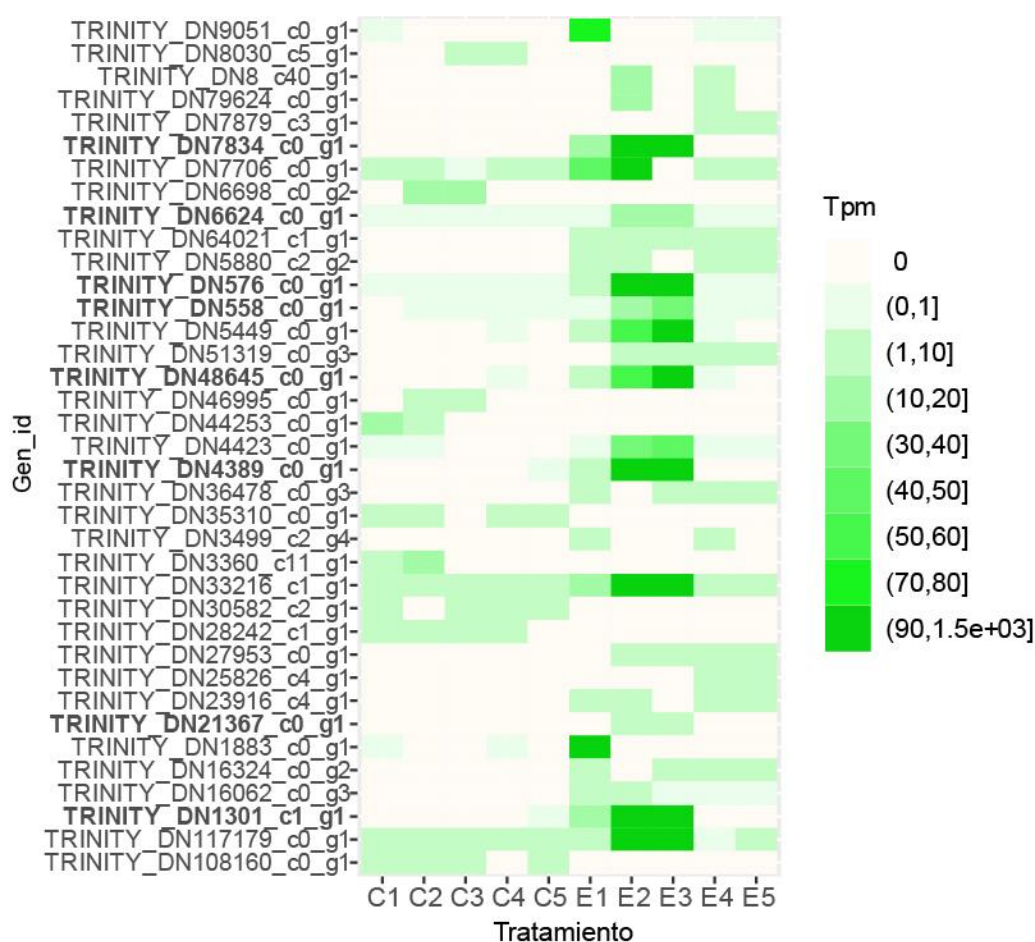


Figura II.2. Genes diferencialmente expresados (GDE) entre machos de *Anastrepha fraterculus* EVG y no expuestos. La figura muestra un subconjunto de 37 GDE ($p < 0.01$, $|FC| > 2$). El subconjunto consta de genes que produjeron al menos un BLAST hit contra bases de datos de proteínas de organismos eucariotas. Los genes destacados corresponden a representantes de los términos GO enriquecidos entre los GDE según el análisis realizado con GOseq.

Tabla II.6. Resumen de resultados del análisis de expresión diferencial. La tabla muestra los resultados obtenidos para el análisis de expresión diferencial para genes expresados en la cabeza de machos EVG y no expuestos (DESeq2).

Análisis de Expresión Diferencial ($p < 0.01$; $ FC > 2$)	
Genes totales en el transcriptoma	158.147
Genes diferencialmente expresados (GDE)	362
Sobre-expresados en machos control	201
Sobre-expresados en machos expuestos	161
Términos GO enriquecidos en GDE	20

Utilizando como base de datos de términos GO asignados a cada gen predicho los resultados obtenidos mediante la anotación del transcriptoma (Trinotate), se encontraron 20 términos

GO sobre-representados (15 en procesos biológicos y 5 en funciones moleculares) en el subconjunto de genes diferencialmente expresados (GDE) (FDR < 0,05) (Tabla II.7).

Tabla II.7. Términos GO sobre-representados en el subconjunto de GDE. La tabla muestra los resultados obtenidos para el análisis de enriquecimiento en términos GO (GOseq).

Términos GO sobre-representados en GDE (GOseq)				
GO term	numDEInCat	numInCat	FDR	Función Molecular
GO:0004517	3	4	1,94E ⁻⁵	nitric-oxide synthase activity
GO:0004568	3	15	1,29E ⁻⁴	chitinase activity
GO:0008061	4	56	8,22E ⁻⁵	chitin binding
GO:0016709	3	20	6E ⁻⁴	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
GO:0010181	3	31	0,003	FMN binding
GO term			FDR	Proceso Biológico
GO:0006809	3	12	1E ⁻⁴	nitric oxide biosynthetic process
GO:0046209	3	13	1,4E ⁻⁴	nitric oxide metabolic process
GO:0006032	4	30	1,94E ⁻⁵	chitin catabolic process
GO:0006030	4	32	1,94E ⁻⁵	chitin metabolic process
GO:1901072	4	32	1,94E ⁻⁵	glucosamine-containing compound catabolic process
GO:0046348	4	34	1,94E ⁻⁵	amino sugar catabolic process
GO:1901071	4	46	5,34E ⁻⁵	glucosamine-containing compound metabolic process
GO:0000272	4	47	8,22E ⁻⁵	polysaccharide catabolic process
GO:0006040	4	55	8,22E ⁻⁵	amino sugar metabolic process
GO:0006026	4	54	8,22E ⁻⁵	aminoglycan catabolic process
GO:2001057	3	19	0,001	reactive nitrogen species metabolic process
GO:1903409	3	24	0,001	reactive oxygen species biosynthetic process
GO:0006022	4	93	0,001	aminoglycan metabolic process
GO:0005976	4	92	0,001	polysaccharide metabolic process
GO:1901136	4	122	0.001	carbohydrate derivative catabolic process

Para cada categoría de términos GO sobre-representados se muestra el número de GDE anotados con esa categoría (numDEInCat), el número de genes total anotados con esa categoría (numInCat), la tasa de descubrimiento falso o *false discovery rate* (FDR) y la función molecular o el proceso biológico al que se corresponden.

Los términos GO sobre-representados en los GDE se encuentran sustentados por 8 genes que se encontraron sobre-expresados en cabezas de machos EVG (Tabla II.8).

Tabla II.8. GDE que sustentan los términos GO sobre-representados. Se muestran 8 GDE que se encuentran sobre-expresados en cabezas de machos EVG que representan a los términos GO enriquecidos.

BLASTp (flybase) db: <i>D. melanogaster</i>				
Proteína predicha Id	Nombre	Referencia en flybase	E-value	%Similitud
TRINITY_DN1301_c1_g1_i19.p1	Mucin 68D	FBgn0036203	5,96E ⁻¹¹	60,7
TRINITY_DN21367_c0_g1_i1.p1	Chitinase 10	FBgn0250907	1E ⁻⁴	63,8
TRINITY_DN4389_c0_g1_i2.p1	Chitin deacetylase	FBgn0034197	2,16E ⁻¹⁴⁹	79,2
TRINITY_DN48645_c0_g1_i2.p1	-	FBgn0085353	1,58E ⁻¹⁰	53,5
TRINITY_DN558_c0_g1_i10.p1	-	FBgn0036226	4,13E ⁻³⁰	39,9
TRINITY_DN576_c0_g1_i53.p1	-	FBgn0038242	2,22E ⁻⁰⁸	80,3
TRINITY_DN6624_c0_g1_i12.p1	Chitinase 8	FBgn0034580	5,31E ⁻¹⁶⁸	70,6
TRINITY_DN7834_c0_g1_i2.p2	No encontrado	No encontrado	-	-

La búsqueda de similitud de secuencias fue realizada a partir de la proteína más larga predicha para cada gen. La proteína predicha sin similitud de secuencia en la base de datos utilizada (flybase) sustenta términos GO relacionados al metabolismo del óxido nítrico (GO:0006809, GO: 0004517, GO:0046209, GO:002001057, GO:0016709, GO:1903409).

Del total de los GDE, 78 poseen al menos una proteína predicha (Transdecoder). De estos genes, 37 produjeron al menos 1 BLASTp Hit cuando fueron alineados contra una base de datos no redundante de proteínas de organismos eucariotas usando Blast2go. Los resultados mostraron que el 72 % de los hits se corresponden a proteínas de moscas tefritidas, siendo en su mayoría de *Anastrepha ludens* (Anexo, Tabla II.9).

Discusión

En este capítulo se exploró el efecto de la exposición a volátiles de guayaba sobre el transcriptoma de la cabeza de machos de *A. fraterculus*. Como primer paso, y debido a la ausencia de un genoma de referencia para esta especie, se llevó a cabo el ensamblado *de novo* del transcriptoma de referencia que luego permitiría la cuantificación de los transcritos. El número de genes predichos estuvo por encima de lo esperado en relación al número de genes informado para otras especies de moscas tefritidas [fuentes: NCBI

(ncbi.nlm.nih.gov/) y Flybase (flybase.org)]. Sin embargo, la sobreestimación de genes es una característica común de los transcriptomas ensamblados *de novo*, provocada principalmente por la redundancia (ensamblado de isoformas o duplicaciones) y la fragmentación del ensamblado (ensamblado de transcritos fragmentados como múltiples *contigs*) (Haas et al., 2013). Luego de reducir la redundancia mediante el filtrado y la clusterización, el ensamblado presentó parámetros de calidad similares a los publicados para ensamblado *de novo* generado a partir de muestras de cabezas de *A. ludens* (Segura-León et al., 2022). Incluso, el análisis de genes ortólogos predichos (BUSCO) mostró que el transcriptoma ensamblado en este estudio presenta un mayor grado de completitud (totales: 90,5 %, de copia única: 89,6 %) que un transcriptoma ensamblado *de novo* para esta misma especie a partir de lecturas provenientes de distintos estadios y sexos (totales: 62,9 %, de copia única: 29,5 %) (Scannapieco et al., 2020).

Si bien genes conocidos por regular el comportamiento de cortejo en insectos como *Fru*, *Dsx* y *Takeout* se encuentran presentes en el transcriptoma ensamblado, no se encontraron diferencias en su expresión entre machos EVG y no expuestos. Por lo tanto, dichos genes no parecen ser los responsables directos del incremento de cortejo observado en machos EVG. De hecho, la anotación funcional y el análisis de enriquecimiento de términos GO de los GDE sugieren que los genes sobre-expresados en machos EVG están involucrados en el catabolismo de polisacáridos y en la síntesis de óxido nítrico.

El comportamiento de cortejo de *A. fraterculus* involucra actividades energéticamente demandantes como el rápido batido de alas, desplazamientos rápidos y la liberación de feromonas (Segura et al., 2007; Gomez Cendra et al., 2011). Por esto, la sobre-expresión de genes relacionados al catabolismo de polisacáridos en machos EVG, podría estar reflejando un mayor consumo energético como consecuencia del aumento en la frecuencia de llamado.

De hecho, se ha observado que el contenido de reservas lipídicas y carbohidratos de los machos puede determinar su participación en leks, es decir en actividades sexuales (Yuval et al., 1998). En el mismo sentido, Warburg y Yuval sugirieron para *C. capitata* que los machos utilizan el glucógeno, previamente sintetizado a partir del consumo de carbohidratos como fuente energética durante el cortejo (Warburg y Yuval, 1997).

Si bien los genes sobre-expresados parecen estar principalmente involucrados en el catabolismo de quitina y no de glucógeno, las vías metabólicas que participan en la transformación de ambos metabolitos, se encuentran estrechamente relacionadas (Klowden, 2007). En efecto, el disacárido trehalosa, el principal producto de la glucogenólisis que es liberado desde el cuerpo graso a la hemolinfa (como fuente energética), es a su vez el recurso primario para la biosíntesis de quitina (Muthukrishnan et al., 2011; Liu et al., 2019). Estudios recientes, mostraron que el silenciamiento de genes que expresan enzimas específicas de la gluconeogénesis o la biosíntesis de trehalosa modifica la expresión de genes específicos del metabolismo de quitina, confirmando la estrecha relación entre ambas rutas metabólicas (Chen et al., 2010; Zhang et al., 2019a; Yu et al., 2021). Por lo tanto, la sobre-expresión de genes relacionados al catabolismo de quitina en machos EVG podría indicar indirectamente un aumento en la biosíntesis de trehalosa. A partir de este carbohidrato, los machos EVG obtendrían la energía necesaria para incrementar la frecuencia de llamado. Además, la estimulación sexual de los machos EVG involucra el incremento de la cantidad de feromona liberada (Bachmann, 2016), lo que también podría afectar la síntesis de quitina. Por ejemplo, en gorgojos algodóneros, varios genes involucrados en la biosíntesis de quitina reducen su transcripción durante la producción de feromona sexual (Perkin et al., 2021). Sin embargo, la relación entre el catabolismo de quitina y la síntesis de feromonas no está del todo clara y debería ser abordada en futuros estudios.

Mediante búsquedas ‘blast’ de secuencias homólogas en otros dípteros, varios de los genes sobre-expresados en machos EVG fueron identificados como quitinasas. Las quitinasas son enzimas que catalizan la degradación de quitina y su expresión se encuentra regulada por hormonas esteroideas, principalmente 20-hidroxiecdisona y hormona juvenil (Kramer y Muthukrishnan, 1997; Liu et al., 2019). Estas hormonas, son producidas en la *corpora allata* y, en insectos adultos, participan en la regulación de actividades reproductivas como la síntesis de feromonas o de proteínas seminales (Adams et al., 1984; Wyatt y Davey, 1996; Jurenka, 2004; Parthasarathy et al., 2009). En *A. fraterculus*, los machos tratados con metopreno, un análogo de la hormona juvenil, exhiben un comportamiento sexual exacerbado y presentan mayor éxito copulatorio que aquellos no tratados (Segura et al., 2009; Bachmann et al., 2017), similarmente a lo ocurrido cuando son expuestos a volátiles de guayaba (Bachmann, 2016). Por tanto, es posible que estas hormonas medien los efectos observados (la estimulación sexual y el aumento en la expresión de quitinasas) en machos de *A. fraterculus* EVG.

Otra función enriquecida en los GDE entre machos EVG y machos control, es la biosíntesis de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). En insectos, el NO es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés), la cual presenta gran actividad en las antenas y neuronas del lóbulo antenal (Bicker, 2001). El NO funciona como un neurotransmisor, estimulando la síntesis de guanilato monofosfato cíclico (cGMP, por sus siglas en inglés) en neuronas diana (Muller, 1997; Bicker, 2001). De hecho, en muchos insectos, las neuronas de proyección que transmiten información olfativa desde los glomérulos antenales hasta neuropilos centrales, acumulan cGMP en respuesta a NO (Heinrich y Ganter, 2007). Además, la señalización mediada por NO/cGMP parece estar involucrada en la variación de la sensibilidad y habituación olfativa a ciertos compuestos incluyendo

feromonas. Esto, en última instancia impone límites a las respuestas comportamentales de los insectos que son mediadas por dichas señales olfativas (Stengl et al., 2001; Heinrich y Ganter, 2007). Por ejemplo, la inhibición de la NOS en las antenas de la mosca de la carne *Neobellieria bullata*, disminuye su respuesta electrofisiológica a la sangre y el ácido valérico, dos poderosos atrayentes para esta especie (Wasserman y Itagaki, 2003). Dado que la extracción de ARN en machos EVG se realizó luego de 4 días de exposición, la sobre-expresión de genes relacionados con la biosíntesis de óxido nítrico podría ser interpretado como una respuesta de adecuación olfativa a compuestos liberados por AG (o bien a feromonas liberadas por conespecíficos, las cuales se encontrarían en mayor concentración respecto a machos control). Así, futuros estudios que comparen la sensibilidad neuronal entre machos EVG y machos control a los compuestos liberados por AG o conespecíficos, podrían ayudar a interpretar los resultados obtenidos en este capítulo. Además, una serie de estudios sugieren que la señalización mediada por NO/cGMP participa en la regulación de células neurosecretoras de hormonas, contribuyendo a la transducción de la actividad neuronal en señales endocrinas (Heinrich y Ganter, 2007). Por lo tanto, también es posible que el aumento de la actividad de NOS sea una consecuencia de su rol en la liberación de hormonas como la 20-hidroxiecdisona o la hormona juvenil. Dada la participación de NO en diversos procesos neuronales y sus reconocidas funciones especie-específicas (Muller, 1997; Heinrich y Ganter, 2007), estudios que caractericen morfológicamente la presencia y actividad de NOS en distintos tejidos de *A. fraterculus* podrían contribuir a comprender más profundamente la estimulación sexual inducida por EVG.

En resumen, en este capítulo, se identificaron 362 GDE entre los cuales no se encontraron genes previamente implicados en la regulación del comportamiento de cortejo. La anotación y el análisis de enriquecimiento funcional del grupo de genes sobre-expresados en machos

EVG, ubicó al catabolismo de quitina y la actividad óxido nítrico sintasa como las funciones biológicas predominantes. Cabe destacar, sin embargo, que la metodología utilizada en este capítulo para identificar las bases genéticas de la estimulación sexual de los machos EVG presenta algunas limitaciones. Por un lado, es probable que los genes involucrados en la estimulación sexual de machos EVG sufran modificaciones de expresión a nivel del ARN sólo en alguno de los tantos tejidos incluidos en las cabezas de los machos. En tal caso, la presencia de ARN proveniente de los otros tejidos de la cabeza diluiría dichas modificaciones, limitando el poder de detección y la potencia del análisis (Torson et al., 2020). Por otro lado, muchos de los genes involucrados podrían no sufrir cambios de expresión a nivel del ARN, pero sí, por ejemplo, a nivel proteico, ya sea alterando la cantidad de proteína activa o modificando su calidad o estado (Torson et al., 2020). Asimismo, otros genes podrían producir ARN no poliadenilado, quedando fuera del poder de detección de la metodología empleada.

Los resultados exploratorios de este capítulo permitieron implicar al catabolismo de polisacáridos en la respuesta de los machos a la EVG. Esto podría ser explicado por un mayor consumo de estos metabolitos por parte de los machos EVG posiblemente asociado al incremento de comportamientos energéticamente costosos como el llamado. Estudios que aborden el rol de los polisacáridos como fuente energética, así como nuevos análisis con un enfoque metabolómico podrían contribuir al esclarecimiento de esta cuestión.

Capítulo III

Estimulación sexual por EVG: Importancia del estado nutricional y consumo de reservas energéticas

Parte de los resultados de este capítulo se encuentran publicados en

Belliard, S. A., Fernández, P. C., Vera, M. T., & Segura, D. F. (2022). Timing of exposure and nutritional status affect male response to guava volatiles, a known courtship enhancer of *Anastrepha fraterculus* *Journal of Pest Science*, 95(1), 279-290

Introducción

El desempeño sexual de los insectos depende en gran medida de su estado nutricional (e.g., Blay y Yuval, 1997; Fricke et al., 2008; Hurtado et al., 2011; Jensen et al., 2015; Kaldun y Otti, 2016; Huck et al., 2021). En este sentido, numerosos estudios han abordado el impacto de la dieta y particularmente de su contenido proteico sobre el comportamiento sexual y el éxito reproductivo de moscas de los frutos (Warburg y Yuval, 1997; Aluja et al., 2001; Levy et al., 2005; Faria et al., 2008; Haq et al., 2010; Roriz y Joachim-Bravo, 2013; Taylor et al., 2013). Por ejemplo, los machos de *C. capitata* alimentados sobre dietas proteicas presentan un mayor índice de llamado, son más atractivos para las hembras y obtienen un mayor número de cópulas que machos alimentados sobre dietas no proteicas (Blay y Yuval, 1997; Kaspi et al., 2000; Shelly et al., 2002; Joachim-Bravo et al., 2009). Similarmente, la frecuencia de llamado, el éxito de apareamiento y el grado de participación en leks es mayor para los machos de *Anastrepha suspensa* que fueron alimentados con suplementos proteicos que para los alimentados únicamente con azúcar (Pereira et al., 2009). La biosíntesis de feromonas también parece estar modulada por la ingesta de proteínas en machos tefrítidos (Epsky y Heath, 1993; Gui et al., 2023). Recientemente, Gui y colaboradores han propuesto que la proteína ingerida por los machos de *B. dorsalis* es metabolizada en el recto, generando dos precursores de la feromona sexual en esta especie, treonina y glicina (Gui et al., 2023). Por otro lado, las hembras que copulan con machos alimentados sobre dietas proteicas presentan una menor tasa de recópula que aquellas que copulan con machos alimentados solo con azúcar, posiblemente como resultado de cambios en la calidad del eyaculado de los machos (Perez-Staples et al., 2008; Gavriel et al., 2009; Abraham et al., 2011, 2012, 2016). Por lo mencionado, incorporar suplementos proteicos en las crías masivas de machos tefrítidos que serán liberados en un contexto de TIE representa una herramienta potente para incrementar

su éxito reproductivo (Pereira et al., 2013). Sin embargo, la proporción utilizada de este tipo de suplementos debe ser cuidadosamente estudiada, ya que un exceso de proteínas podría tener consecuencias negativas sobre el rendimiento sexual y la longevidad de las moscas (Teal et al., 2004; Prabhu et al., 2008; Fanson et al., 2009; Oviedo et al., 2011).

Las actividades reproductivas involucran mecanismos fisiológicos (como la síntesis de feromonas o proteínas seminales) y comportamentales (como el cortejo) energéticamente demandantes. Por esto, cuando los insectos se alimentan sobre dietas nutricionalmente restrictivas, la proporción de los recursos energéticos asignados a actividades reproductivas o de supervivencia puede resultar crucial para maximizar el *fitness* (Boggs, 2009; Nestel et al., 2016). En estas circunstancias, la capacidad de reasignar recursos hacia actividades de mantenimiento a expensas de actividades reproductivas fue propuesto como un mecanismo que permitiría a los insectos soportar condiciones ambientales adversas y reproducirse cuando estas sean propicias (Nestel et al., 2016; Zhang et al., 2019b). Asimismo, ciertos estímulos olfativos, como los volátiles liberados por plantas hospedantes, podrían funcionar como una señal indicadora de dichas condiciones, revelando, por ejemplo, la disponibilidad de alimentos o de sitios de oviposición (Landolt y Phillips, 1997). De este modo, los estímulos olfativos podrían modular el balance en la asignación de recursos energéticos y, a su vez, el comportamiento reproductivo de los insectos bajo condiciones nutricionales restrictivas.

En algunos tefrítidos, se ha documentado que el efecto estimulador de la exposición a ciertos fitoquímicos sobre el comportamiento sexual de los machos depende de su estado nutricional (Quilici et al., 2013; Kouloussis et al., 2017). Por ejemplo, la estimulación sexual de los machos de *Ceratitis rosa* tras ser expuestos a un aceite esencial de naranja (OO, por sus siglas en inglés) fue observada sobre machos alimentados con azúcar, pero no se observaron diferencias entre machos expuestos y no expuestos cuando fueron alimentados

con un suplemento proteico (Quilici et al., 2013). Además, el éxito de apareamiento de los machos expuestos y alimentados con azúcar fue comparable al éxito de apareamiento alcanzado por los machos alimentados con un suplemento proteico. Sin embargo, se encontraron resultados opuestos cuando se estudió la interacción entre el estado nutricional de los machos de *C. capitata* y el efecto de una exposición a compuestos cítricos. En este caso, el efecto estimulador de la exposición sobre el índice de llamado fue evidenciado solo sobre machos alimentados con una dieta proteica mientras que los machos alimentados con azúcar no fueron estimulados por la exposición (Kouloussis et al., 2017). Por otro lado, el efecto estimulador de la exposición a GRO sobre el comportamiento sexual de *C. capitata* y *C. rosa* parece ser independiente de su estado nutricional (Shelly et al., 2003; Quilici et al., 2013). Así, la estimulación sexual mediada por claves olfativas podría depender no sólo de la identidad de los estímulos sino del estado fisiológico y nutricional de los machos que los perciben.

En *A. fraterculus*, la calidad de la fuente proteica (principalmente derivados de levaduras) utilizada en la dieta puede determinar la competitividad sexual de los machos (Liendo et al., 2013). Los machos alimentados con una dieta de azúcar y levadura hidrolizada –una fuente proteica comúnmente utilizada en la cría masiva de moscas de la fruta (Aceituno-Medina y Hernández, 2020)– presentan mayor competitividad sexual que aquellos alimentados sobre una dieta de azúcar y levadura de cerveza, una fuente proteica de menor calidad (Liendo et al., 2013). Sin embargo, hasta ahora, el efecto estimulador de la EVG sobre el comportamiento sexual de *A. fraterculus* fue ensayado solo sobre machos alimentados con una mezcla de azúcar y levadura de cerveza. En este capítulo, se estudió el efecto de la EVG en machos alimentados sobre diferentes dietas. Con el objetivo de investigar la inversión energética durante la exposición, se estimó el contenido de glucógeno, triglicéridos y

proteínas en machos EVG y no expuestos durante períodos de acceso al alimento y períodos sin acceso.

Materiales y Métodos

Efecto de la interacción entre la dieta y la EVG sobre el comportamiento de llamado

Para evaluar si el efecto de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos depende de su estado nutricional, se evaluó el efecto de la EVG sobre machos alimentados con diferentes dietas. Para esto, machos recientemente emergidos fueron agrupados de a 5 en frascos de vidrio de 3 L tapados con tul. A cada grupo de machos se le asignó, al azar, un tratamiento de exposición (EVG o no expuesto) y una de tres posibles dietas: 1) S: azúcar (Ledesma, Argentina) sin proteína 2) BY: dieta proteica de baja calidad consistiendo en una mezcla de azúcar y levadura de cerveza (CALSA, Argentina) en una proporción 3:1, y 3) HY: dieta proteica de alta calidad consistiendo en una mezcla de azúcar e hidrolizado de levadura (MP Biomedicals, Estados Unidos) en una proporción 12:1. Las dietas fueron seleccionadas por haber mostrado un impacto diferencial sobre el desempeño reproductivo de *A. fraterculus* (Liendo et al., 2013; Goane et al., 2018). Además, mientras que el efecto de la EVG ha sido hasta ahora estudiado en machos alimentados con BY (Vera et al., 2013; Bachmann et al., 2015), la dieta de alta calidad (HY) es actualmente utilizada en biofábricas de moscas de los frutos como dieta de pre-liberación de machos (Aceituno-Medina y Hernández, 2020). Durante todo el experimento, los machos fueron mantenidos dentro de incubadoras (Sanyo, MLR350, Japón) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo 12:12 h (luz:oscuridad), y alimentados *ad libitum* con la dieta asignada y agua. El tratamiento de EVG se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo I para la exposición tardía con AG. Así, los machos fueron expuestos a 20 μL de AG entre los días 8 y 11 post-emergencia durante 4 horas por día. El día 12 post-

emergencia se registró, para cada grupo y cada 20 minutos durante la primera hora de luz (8:30 a 9:30), la proporción de machos que se encontraban realizando el comportamiento de llamado (i.e., el índice de llamado). Para cada combinación de dieta y tratamiento de exposición, se realizaron 24 réplicas con machos provenientes de 6 lotes diferentes.

Efecto de la EVG sobre el consumo de reservas energéticas

Con el fin de determinar si el efecto estimulador de la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos afecta el consumo de sus reservas energéticas, se estimó el contenido de glucógeno, triglicéridos y proteínas en machos EVG y no expuestos durante distintas etapas del tratamiento y en distintas condiciones de alimentación. Para esto, grupos de 5 machos fueron colocados en frascos de vidrio de 3 L y alimentados desde su emergencia con agua y una dieta de azúcar y levadura de cerveza (3:1). El día 8 post-emergencia, los grupos fueron asignados al azar a uno de dos posibles tratamientos: con exposición (machos EVG) o sin exposición (machos control). El tratamiento de exposición se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita para la exposición tardía a AG en los capítulos I y II: los grupos de machos fueron expuestos a 20 μ L de AG entre los días 8 y 11 post-emergencia durante 4 h por día (de 12:00 a 16:00 h). Con el fin de evaluar el efecto de la EVG sobre las reservas energéticas de moscas sin acceso a fuentes de energía que les permitieran recuperar reservas, el día 10 post-emergencia todos los grupos de machos fueron traspasados a nuevos frascos con agua, pero sin alimento. Los días 8, 10, 11 y 12 post-emergencia, un total de entre 35 y 124 machos de cada tratamiento y edad fueron separados a las 12:00 h para el análisis de reservas energéticas (contenido de glucógeno, triglicéridos y proteínas). Además, desde el día 8 hasta el día 13 post-emergencia, se registró, para cada grupo de machos durante la primera hora de luz (de 8:30 a 9:30 h) y cada 20 minutos, la proporción de machos llamando. Se

utilizaron 6 lotes de moscas (grupos de moscas obtenidas a partir de huevos colectados de la colonia del laboratorio el mismo día) cada uno constando de entre 6 y 12 réplicas por tratamiento. Los machos separados para los análisis de reservas energéticas fueron anestesiados con frío e individualmente secados por 24 h a 50 °C (VO500, Memmert, Alemania), y el peso seco de cada individuo fue registrado utilizando una balanza de precisión (APX-200, Denver, España). Luego, los individuos de cada tratamiento y edad fueron separados en tres grupos y cada grupo fue asignado al azar a uno de tres posibles análisis: 1) determinación del contenido de glucógeno, 2) determinación del contenido de triglicéridos o 3) determinación del contenido de proteínas.

Estimación del contenido de glucógeno

Para estimar el contenido de glucógeno de los machos de cada tratamiento (EVG y control) y edad (8, 10, 11 y 12 días) fueron individualmente homogeneizados en frío con 500 µL de solución amortiguadora¹¹ (PBS, 1X) en un tubo Eppendorf. Cada homogenato fue centrifugado (Z216MK, Labortechnik GmbH, Alemania) a 5 °C y 14.000 rpm durante 3,5 minutos. Luego, 450 µL del sobrenadante fueron traspasados a un nuevo tubo y todas las muestras fueron conservadas a -70 °C hasta su utilización. El contenido de glucógeno de cada muestra fue estimado indirectamente utilizando un kit colorimétrico para la determinación de glucosa (Wiener Lab, Argentina), por lo que el glucógeno fue previamente hidrolizado mediante una reacción enzimática. Para esto, 50 µL de cada muestra fueron incubados con 0.5 µL (1UE) de una amiloglucosidasa purificada desde *Aspergillus niger* (Merck KGaA, Alemania) durante 1 h a 37 °C (VO500, Memmert, Alemania). Luego, a cada muestra se le adicionó 1 ml de reactivo de trabajo (solución conteniendo glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-

¹¹ Phosphate Buffered Saline (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄.

aminofenazona) y se incubó durante 25 minutos a 25 °C. Al finalizar la incubación, tres alícuotas de 200 µL de cada muestra se dispensaron en una placa ELISA y la absorbancia de cada pocillo fue medida utilizando un espectrofotómetro (BioTek Synergy HT, Agilent, EEUU) a una longitud de onda de 505 nm. Además, en cada placa también se registró la absorbancia de una muestra control (PBS 1X, tratado de manera similar a los homogenatos) y de 6 diluciones de una solución estándar de glucosa (50, 100, 200, 400, 800 y 1000 µg/mL) que permitieron construir las curvas de concentración en función de la absorbancia. El contenido de glucógeno se estimó para un total de 71 individuos (15, 15, 60 y 52 para las edades de 8, 10, 11 y 12 días respectivamente) por tratamiento.

Estimación del contenido de triglicéridos

Para estimar el contenido de triglicéridos, los machos de cada tratamiento (EVG y control) y edad (8, 10, 11 y 12 días) fueron individualmente homogeneizados con 250 µL de PBS 1X en un tubo Eppendorf. Cada homogenato fue centrifugado (Z216MK, Labortechnik GmbH, Alemania) a 5 °C y 14.000 rpm durante 3,5 minutos. Luego, 200 µL del sobrenadante fueron traspasados a un nuevo tubo y las muestras fueron conservadas a -70 °C hasta su utilización. El contenido de triglicéridos se estimó utilizando el Kit enzimático TG-color-GPO (Wiener Lab, Argentina). Para esto, 70 µL de cada muestra fueron incubados con 700 µL de reactivo de trabajo (una solución conteniendo cloroenol, lipoproteína lipasa, glicerol quinasa, glicerol fosfato oxidasa, peroxidasa, adenosina trifosfato y 4-aminofenazona) durante 20 minutos a 25 °C. Al finalizar la incubación, tres alícuotas de 200 µL de cada muestra se dispensaron en una placa ELISA y la absorbancia de cada pocillo fue medida utilizando un espectrofotómetro (BioTek Synergy HT, Agilent, Estados Unidos) a una longitud de onda de 505 nm. Además, en cada placa también se registró la absorbancia de una muestra control (PBS 1X, tratado de

manera similar a los homogenatos) y de 5 diluciones de una solución estándar de trioleína (10, 50, 120, 250 y 400 µg/mL) que permitieron construir las curvas de concentración en función de la absorbancia. El contenido de triglicéridos se estimó para un total de 105 individuos (10, 10, 50 y 35 para las edades de 8, 10, 11 y 12 días respectivamente) por tratamiento.

Estimación del contenido de proteínas

Para estimar el contenido de proteínas, los machos de cada tratamiento (EVG y control) y edad (8, 10, 11 y 12 días) fueron individualmente homogeneizados con 250 µL de una solución de PBS 1X e inhibidor de proteasas (cOmplete™ mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Alemania) en un tubo Eppendorf. Cada homogenato fue centrifugado (Z216MK, Labortechnik GmbH, Alemania) a 5 °C y 14.000 rpm durante 3,5 minutos. Luego, 200 µL del sobrenadante fueron traspasados a un nuevo tubo y todas las muestras fueron conservadas a -70 °C hasta su utilización. El contenido proteico de cada homogenato se estimó utilizando un Kit (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, Estados Unidos) basado en la determinación colorimétrica de la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para esto, 50 µL de cada muestra fueron incubados con 1 mL de Reactivo de Bradford (diluido según las instrucciones del fabricante) durante 30 minutos a 25 °C. Al finalizar la incubación, tres alícuotas de 200 µL de cada muestra se dispensaron en una placa ELISA y la absorbancia de cada pocillo fue medida utilizando un espectrofotómetro (BioTek Synergy HT, Agilent, Estados Unidos) a una longitud de onda de 595 nm. Además, en cada placa también se registró la absorbancia de una muestra control (una solución de PBS 1X e inhibidor de proteasas tratada de manera similar a los homogenatos) y de 4 diluciones de una solución estándar de albúmina (125, 250, 500 y 1000 µg/mL) que permitieron construir las curvas de concentración

en función de la absorbancia. El contenido de triglicéridos se estimó para un total de 46 individuos (10, 10, 14 y 12 para las edades de 8, 10, 11 y 12 días respectivamente) por tratamiento.

Análisis de datos

Para estimar el efecto de la interacción entre la EVG y la dieta sobre el comportamiento de llamado, se modelaron medidas repetidas del índice de llamado en función del tratamiento de exposición y la dieta utilizando un modelo lineal generalizado con distribución binomial [función de enlace *logit*, función *glmer* del paquete *lme4* (Bates et al., 2015)]. La dieta y el tratamiento de exposición se incluyeron como un factor fijo, mientras que el frasco y el lote se incluyeron como factores aleatorios. Todas las comparaciones fueron realizadas utilizando la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth, 2020).

Para la determinación del contenido de reservas energéticas, los datos de absorbancia de cada reacción enzimática fueron adquiridos mediante el software Biotek Gen 5.0 v.2.0. Para cada placa, el promedio de la absorbancia de la muestra control fue restado al promedio de la absorbancia de cada muestra. Además, para cada placa, la absorbancia de cada muestra estándar se graficó en función de su concentración con el objetivo de estimar, mediante la ecuación de la curva, la concentración de todas las muestras incógnita. La concentración de cada muestra se normalizó dividiendo la concentración calculada por el peso seco del individuo. Para cada tipo de reserva (glucógeno, triglicéridos, proteínas) se calculó la concentración basal normalizada como el promedio de la concentración normalizada de las muestras obtenidas el día 8 post-emergencia (antes del inicio del tratamiento de exposición). Luego, para cada muestra (en los días 10, 11 y 12 post-emergencia) se calculó el consumo acumulado como la diferencia entre la concentración normalizada de la muestra y la

concentración normalizada basal. Para estimar el efecto la EVG sobre la utilización de reservas energéticas, para cada tipo de reserva, el consumo acumulado se modeló en función del tratamiento de exposición y la edad (o día de ensayo) utilizando un modelo lineal generalizado con distribución normal [función *lmer* del paquete *lme4* (Bates et al., 2015)]. La edad y el tratamiento de exposición se incluyeron como un factor fijo, mientras que la placa y el lote se incluyeron como factores aleatorios. Todas las comparaciones fueron realizadas utilizando la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth, 2020). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software R v.4.2.1 (R Core Team, 2021).

Resultados

Efecto de la interacción entre la dieta y la EVG sobre el comportamiento de llamado

La dieta suministrada a los machos afectó fuertemente su índice de llamado ($\text{ChiSq}_2 = 142,21$, $p < 0,001$), siendo los machos alimentados con la dieta de alta calidad los que presentaron los mayores valores (Figura III.1). Además, el efecto de la EVG sobre el índice de llamado de los machos también dependió de la dieta suministrada a los mismos ($\text{ChiSq}_2 = 10,73$, $p = 0,0047$). Cuando los machos fueron alimentados con una dieta proteica de baja calidad (BY), el *odds* del índice de llamado de los machos EVG fue en promedio 1,5 veces mayor respecto al de machos control ($Z_{\text{ratio}} = 3,74$; $p = 0,0025$). En contraste, no se encontraron diferencias en el índice de llamado entre machos EVG y machos control cuando fueron alimentados con azúcar (S) ($Z_{\text{ratio}} = 0,732$; $p = 0,9792$) o con una dieta proteica de alta calidad (HY) ($Z_{\text{ratio}} = 1,80$; $p = 0,4674$) (Figura III.1).

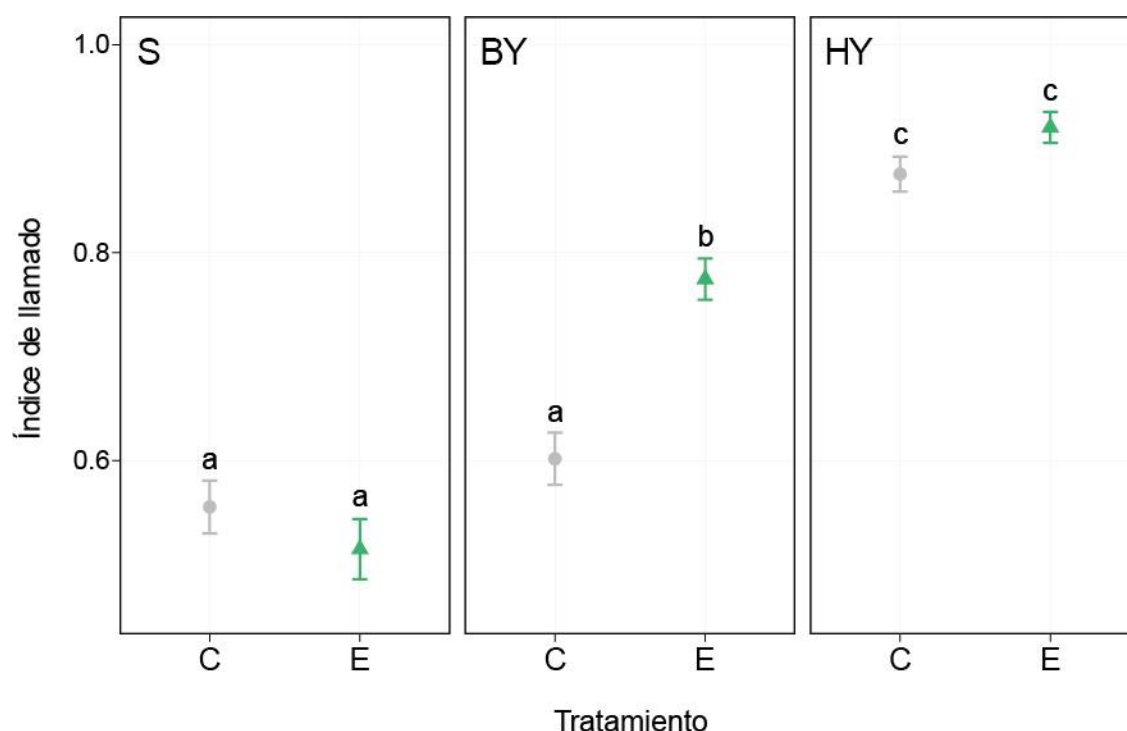


Figura III.1. Efecto de la dieta y la EVG sobre el comportamiento sexual de los machos de *Anastrepha fraterculus*. Se muestra, para cada tipo de dieta [azúcar (S), proteica de baja calidad (BY) o proteica de alta calidad (HY)], el promedio del índice de llamado (número de machos llamando/total de machos) para machos expuestos a volátiles de guayaba (E, verde) y no expuestos (C, gris). Las barras representan el error estándar y letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Efecto de la EVG sobre el consumo de las reservas energéticas de los machos

Al inicio del experimento (día 8 post-emergencia), el índice de llamado no difirió entre machos EVG y machos control ($Z_{\text{ratio}} = 0,315$; $p = 0,75$). Mientras los machos tuvieron acceso al alimento (día 10 post-emergencia), no se encontraron diferencias entre machos EVG y machos no expuestos en el consumo acumulado para ningún tipo de reserva [glucógeno: $T_{\text{ratio}} = 4,26$; $p = 0,41$; triglicéridos: $T_{\text{ratio}} = 1,20$; $p = 0,23$ y proteínas: $T_{\text{ratio}} = 1,01$; $p = 0,32$, respectivamente) (Figura III.2, B, C y D). Sin embargo, el *odds* del índice de llamado fue en promedio 0,7 veces mayor para machos expuestos que para machos control ($Z_{\text{ratio}} = 2,28$; $p = 0,02$) (Figura III.2, A). Después de 20 horas desde la privación del alimento (el día 11 post-emergencia) los machos EVG presentaron un mayor consumo acumulado de glucógeno ($T_{\text{ratio}} = 4,26$; $p < 0,001$) y triglicéridos ($T_{\text{ratio}} = 4,07$; $p < 0,0001$) respecto a los machos control,

mientras que no se observaron diferencias en el consumo acumulado de proteínas ($T_{ratio} = 1,01$; $p = 0,32$) (Figura III.2, B, C y D). Además, el *odds* del índice de llamado fue en promedio 1,06 veces mayor para machos EVG que para machos control ($Z_{ratio} = 5,06$; $p < 0,001$) (Figura III.2, A). Por último, cuando los machos alcanzaron 42 horas de hambreado (el día 12 post-emergencia) no se encontraron diferencias en el consumo acumulado de glucógeno ($T_{ratio} = 1,01$; $p = 0,315$) y proteínas ($T_{ratio} = 1,10$; $p = 0,28$) (Figura 3.2, B y D), mientras que el consumo acumulado de triglicéridos fue mayor para machos EVG que para machos control ($T_{ratio} = 3,99$; $p < 0,001$) (Figura III.2, C). Además, el *odds* del índice de llamado de los machos EVG fue 0,5 veces menor que el de machos control ($Z_{ratio} = 4,50$; $p < 0,001$) (Figura III.2, A). Al finalizar el experimento, y luego de 66 horas de hambreado, el índice de llamado de los machos alcanzó su nivel más bajo y no se observaron diferencias entre machos EVG y machos control ($Z_{ratio} = 0,80$; $p = 0,42$).

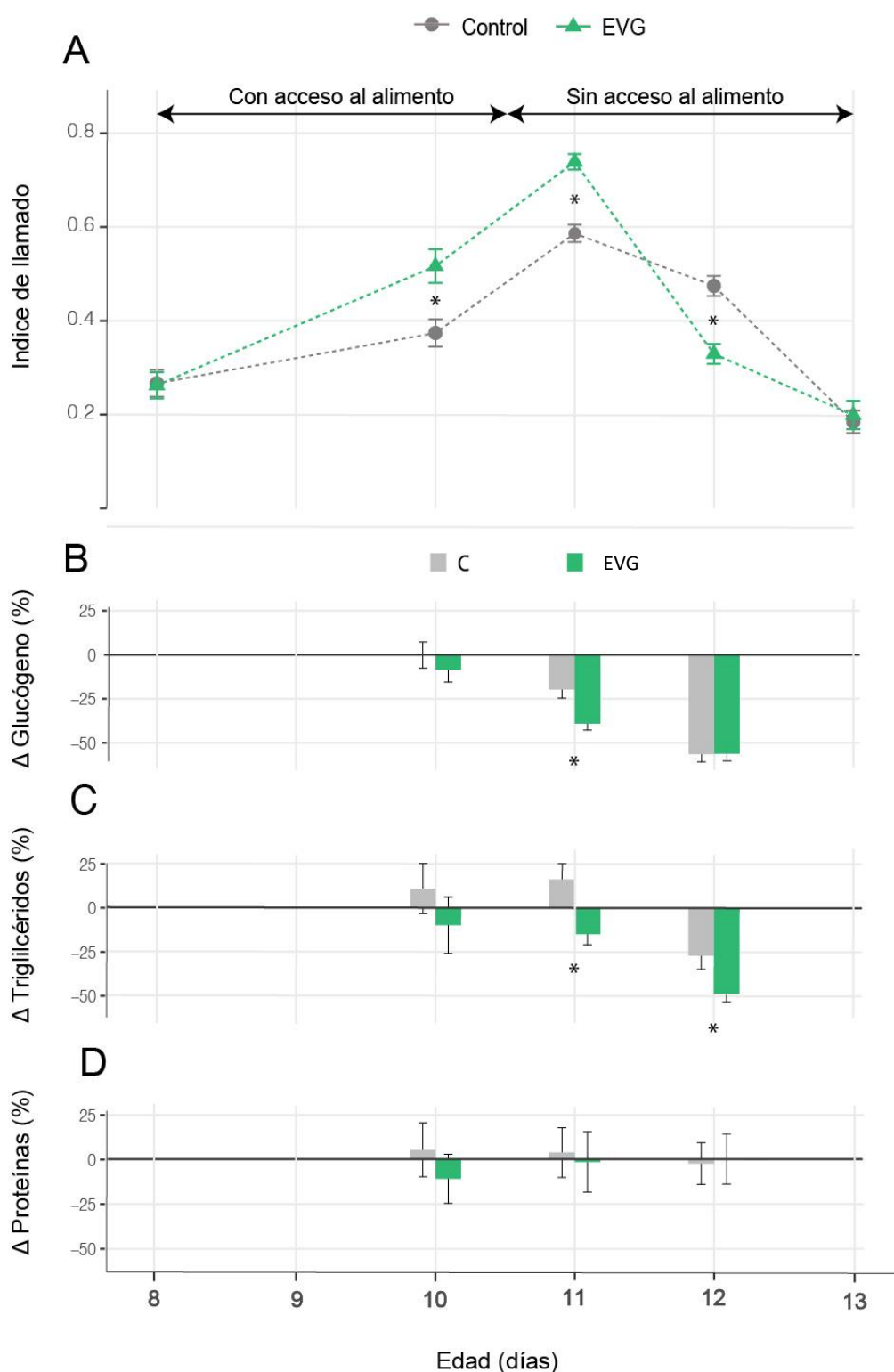


Figura III.2. Efecto de la EVG sobre el consumo de las reservas energéticas de los machos. La figura muestra el promedio del índice de llamado (número de machos llamando/número de machos totales) para machos EVG (verde) y machos no expuestos (gris) a lo largo de los 5 días del ensayo y diferentes condiciones de alimentación. Las observaciones fueron realizadas entre las 8:30 y las 9:30 h. mientras que la exposición se llevó a cabo entre las 12:00 y las 16:00 h. (A). Para los días 10, 11 y 12, se muestra el porcentaje promedio de consumo acumulado (diferencia entre la concentración calculada para cada día y el promedio de la concentración basal, calculada para el día 8) de reservas energéticas (B: glucógeno, C: triglicéridos y D: proteínas) para machos EVG (barras verdes) y machos control (barras grises). Las barras negras indican el error estándar para cada promedio y los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Discusión

En este capítulo se evaluó el efecto de la dieta suministrada a los machos sobre el índice de llamado, así como su interacción con un tratamiento de EVG. Los resultados mostraron que tanto el índice de llamado como el efecto estimulador de la EVG dependen del estado nutricional de los machos. En concordancia con estudios realizados sobre varias especies de moscas de los frutos de la familia Tephritidae (Aluja et al., 2001; Teal et al., 2007; Roriz y Joachim-Bravo, 2013), el índice de llamado de los machos de *A. fraterculus* alimentados sobre dietas proteicas de alta calidad (HY) fue mayor que el índice de aquellos alimentados sobre dietas no proteicas (S). Además, cuando los machos se alimentaron sobre una dieta proteica, pero de baja calidad (BY) presentaron un índice de llamado similar al de los machos alimentados sólo con azúcar. Las dietas proteicas utilizadas en este trabajo no solo difieren en el origen de la proteína utilizada, sino en su proporción. La dieta proteica HY estuvo conformada por una mezcla de azúcar e hidrolizado de levadura en una proporción 12:1, mientras que la dieta proteica BY se conformó de azúcar y levadura de cerveza en una proporción 3:1. Como se mencionó anteriormente, un exceso de proteínas puede afectar negativamente el comportamiento reproductivo de las moscas de los frutos (Prabhu et al., 2008; Oviedo et al., 2011). Por lo tanto, el menor índice de llamado observado sobre machos alimentados con BY (respecto al observado para alimentados sobre HY) podría deberse a un efecto negativo causado por la ingesta de un alimento con una proporción de proteínas demasiado elevada. Sin embargo, un estudio previo mostró que el éxito copulatorio de *A. fraterculus* no difirió entre machos que fueron alimentados sobre una dieta proteica HY en una proporción azúcar:proteína 12:1 (como la utilizada en este estudio) o en una proporción 3:1 (como la utilizada en este estudio para BY) (Liendo et al., 2013). Entonces, tal como sugiere Liendo y colaboradores, la calidad de la fuente proteica que compone la dieta de los machos

también puede ser un factor determinante de su competitividad sexual (Liendo et al., 2013). Por ejemplo, el hidrolizado de levadura utilizado como fuente proteica en la dieta HY contiene aproximadamente un 30 % más de glicina (un aminoácido precursor de la feromona en *B. tryoni*) que la levadura de cerveza de la dieta BY (Goane et al., 2018; Gui et al., 2023). Asimismo, mientras que el hidrolizado de levadura contiene minerales, vitaminas y otros micronutrientes que pueden afectar características reproductivas de los insectos (Cohen, 2015), en el caso de la levadura de cerveza utilizada en este estudio, éstos compuestos no fueron declarados por sus fabricantes (Goane et al., 2018). Por lo tanto, la diferencia observada en el índice de llamado para machos alimentados sobre las distintas dietas proteicas podría ser consecuencia de la presencia o la proporción diferencial de ciertos aminoácidos y nutrientes esenciales.

Además, en concordancia con estudios realizados sobre machos de *C. rosa* expuestos a volátiles de aceite esencial de naranja (Quilici et al., 2013), los resultados de este capítulo mostraron que el efecto estimulador de la EVG sobre el comportamiento sexual de *A. fraterculus* depende de la dieta suministrada a los machos adultos. El incremento del índice de llamado tras un tratamiento de EVG sólo se evidenció cuando los machos fueron alimentados con BY, siendo esta la dieta utilizada en los estudios previos que describieron el efecto estimulador de la exposición a guayaba (ya sea utilizando como fuente de volátiles tanto frutas como compuestos sintéticos) (Vera et al., 2013; Bachmann et al., 2015, 2019; Capítulos I y II de esta tesis). Estos resultados sugieren que el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus* responde a la interacción entre factores internos (como el estado nutricional) y factores externos (como estímulos olfativos).

En muchas especies de insectos, el estado nutricional puede condicionar la sensibilidad olfativa, generalmente mediante cambios en la expresión de receptores odorantes o

proteínas asociadas a la quimiorrepción (Gadenne et al., 2016). Entonces, el efecto estimulador de EVG sobre machos de *A. fraterculus* alimentados con BY podría ser consecuencia de una mayor sensibilidad a ciertos compuestos liberados por frutos de guayaba respecto a los machos que fueron alimentados sobre HY o S. Futuros estudios que sean capaces de estimar la sensibilidad de la antena a compuestos liberados por guayaba (utilizando, por ejemplo, electroantenografía) o bien la expresión diferencial de receptores olfativos entre machos alimentados sobre distintas dietas podrían ayudar a interpretar los resultados observados.

Por otro lado, los machos que se alimentaron con S o BY posiblemente se encuentren nutricionalmente limitados en comparación con aquellos alimentados con HY. Bajo estas condiciones nutricionales, los machos podrían asignar sus recursos energéticos hacia actividades de mantenimiento hasta que las condiciones externas o internas favorezcan la reproducción (Nestel et al., 2016). En este contexto, y teniendo en cuenta que la guayaba es uno de los principales hospedantes de *A. fraterculus* (Hernández-Ortiz, 2020), la EVG podría representar un estímulo olfativo que anticipe dichas condiciones. Así, la percepción de esta señal, provocaría la reasignación de recursos energéticos hacia actividades reproductivas, lo que, a su vez, se reflejaría en un incremento del índice de llamado, tal como se observó para machos alimentados sobre BY. Sin embargo, el hecho de que la EVG no haya modificado el comportamiento sexual de machos alimentados con azúcar, sugiere que la capacidad de incrementar el índice de llamado requeriría un nivel nutricional basal que no alcanzaron los machos alimentados únicamente con carbohidratos. La síntesis de feromonas o la actividad locomotora requerida durante los despliegues de cortejo, podrían depender de la ingesta de nutrientes específicos o aminoácidos esenciales. Estos elementos podrían actuar como

precursores feromonales o bien satisfacer la demanda energética que estos comportamientos y procesos fisiológicos conllevan.

Aunque el consumo de azúcares, lípidos y proteínas ha sido investigado en algunas especies de moscas de los frutos durante actividades reproductivas (Warburg y Yuval, 1997; Yuval et al., 1998; Zur et al., 2009), el consumo diferencial de reservas energéticas entre machos expuestos a fitoquímicos estimulantes y machos no expuestos no había sido investigado hasta ahora. Discrepando con Yuval y colaboradores, quienes encontraron que la concentración de proteínas en los machos de *C. capitata* disminuye durante su participación en los leks (Yuval et al., 1998); los resultados de este capítulo mostraron que el consumo acumulado de proteínas se mantuvo constante y no difirió entre machos EVG y no expuestos, incluso durante un período de hambreado. Además, durante el período del ensayo en el que los machos tuvieron acceso constante al alimento, si bien los machos EVG presentaron en promedio un mayor consumo acumulado de glucógeno y triglicéridos, no se observaron diferencias significativas respecto a los machos control. No obstante, cuando los machos fueron privados de alimento (el día 11 post-emergencia, luego de 20 horas de ayuno), el consumo acumulado de glucógeno y triglicéridos fue mayor para machos EVG que para machos control, coincidiendo con el mayor índice de llamado observado en horas previas para machos EVG. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que los machos pueden reasignar recursos energéticos hacia actividades reproductivas cuando son estimulados con volátiles de guayaba. Además, el gasto energético podría compensarse con el consumo de alimento cuando los machos tienen acceso al mismo, lo que explicaría la ausencia de una diferencia entre machos EVG y control durante el período de acceso al alimento. Esta hipótesis, sin embargo, podría recibir mayor apoyo mediante un estudio futuro que evalúe el

consumo de alimento junto con la concentración de glucógeno y triglicéridos en machos EVG y no expuestos.

Luego de un ayuno prolongado (el día 12 post-emergencia, luego de 44 horas de hambreado), el consumo acumulado de glucógeno se equiparó entre machos EVG y machos control, lo que representa un mayor consumo por parte de los machos control entre el día 11 y 12 post-emergencia. Este resultado, junto con el menor índice de llamado presentado por machos EVG respecto a machos control durante el día 12 post-emergencia sugiere que comportamiento de llamado se encuentra fundamentalmente sostenido por el consumo de reservas de carbohidratos. Concordantemente, estudios previos han sugerido que las reservas de glucógeno disminuyen luego de que los machos participan en leks debido al consumo de glucosa requerido durante los despliegues sexuales (Warburg y Yuval, 1997; Yuval et al., 1998).

En un escenario de control poblacional por TIE, tanto la dieta suministrada como la exposición a fitoquímicos representan herramientas útiles para estimular el comportamiento sexual de los machos estériles que serán liberados a campo (Pereira et al., 2013, 2021; Silva et al., 2013; Hernández et al., 2020). En este contexto, la implementación de un tratamiento de EVG para estimular a los machos de *A. fraterculus* dependerá en gran medida de la dieta utilizada en la cría. Por un lado, una dieta proteica de alta calidad (HY) permitiría evitar la implementación de un tratamiento adicional. Por el otro, suministrar una dieta de baja calidad junto con un tratamiento de EVG podría implicar una reducción significativa de los costos de cría en términos económicos¹². Sin embargo, los machos utilizados en este trabajo no fueron

¹² Actualmente, el precio de mercado para la levadura cerveza (BY) es 10 veces menor que para el hidrolizado de levadura (HY).

esterilizados, por lo que para conocer el efecto de la dieta y la EVG en un contexto de TIE, debería previamente validarse estos resultados sobre machos estériles criados masivamente.

Capítulo IV

Estimulación sexual por EVG: Identificación de los compuestos responsables

Los resultados de este capítulo se encuentran publicados en

Belliard S. A., Bachmann G. E., Fernández P. C., Hurtado J., Vera M. T. y Segura, D. F. (2022). Identification of host plant volatile stimulants of *Anastrepha fraterculus* male courtship behavior
[Frontiers in Ecology and Evolution, 10:343260](#)

Introducción

La habilidad de los insectos para sincronizar su actividad sexual con factores ambientales propicios para el desarrollo de su descendencia (como la disponibilidad de alimento o sitios para la oviposición) puede ser un componente fundamental a la hora de incrementar su *fitness*. En este sentido, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) liberados por las plantas hospedantes pueden actuar, no solo como claves indicadoras de la presencia de sitios de oviposición y alimentación (Landolt y Phillips, 1997; Tumlinson, 2014; Moreau et al., 2017; Xu y Turlings, 2018), sino también como señales ambientales desencadenantes del comportamiento sexual y la síntesis de feromonas (Reddy y Guerrero, 2004; Borrero-Echeverry et al., 2018).

Como se mencionó en los capítulos anteriores, el comportamiento sexual y el éxito de apareamiento de varias especies de moscas de los frutos puede ser estimulado por VOCs liberados desde plantas hospedantes (revisado por Segura et al., 2018). Por ejemplo, el α -copeno, un fitoquímico ampliamente distribuido entre los hospedantes de *Ceratitis capitata*, actúa como una señal de larga distancia para la agregación de los machos en sitios de lek y estimula su comportamiento sexual (Nishida et al., 2000; Shelly, 2001a). Similarmente, el éxito de apareamiento de *Bactrocera oleae* aumenta cuando los machos son expuestos a α -pineno, un compuesto emitido por los frutos del olivo, el único hospedante de esta especie (Gerofotis et al., 2013; Kokkari et al., 2021). El efecto de ambos compuestos sobre el comportamiento reproductivo de *C. capitata* y *B. oleae* podría ser producto de la adaptación de estas especies a la explotación de sus hospedantes. En algunos casos, los mismos compuestos que estimulan el éxito de apareamiento de los tefrítidos también forman parte de los volátiles liberados por los machos durante el cortejo (Segura et al., 2018). De hecho, el α -pineno y el α -copaeno se identificaron entre los volátiles liberados por de *B. oleae* y *C.*

capitata, respectivamente (Mazomenos y Haniotakis, 1981; Vaníčková et al., 2012). Estos hallazgos se condicen con la hipótesis de la explotación sensorial, según la cual, los compuestos feromonales similares o iguales a los compuestos liberados por los hospedantes han evolucionado explotando el sesgo sensorial preexistente en conespecíficos hacia estos VOCs (Ryan, 1990).

Anastrepha fraterculus es un complejo de especies crípticas que presenta un amplio rango de distribución en el continente americano (Hernández-Ortiz et al., 2019). Una revisión reciente de los hospedantes de este complejo mostró que, a pesar de las diferencias entre poblaciones a nivel regional, la guayaba (*Psidium guajava*), un hospedante nativo de América, es el único compartido por todas las poblaciones estudiadas (Hernández-Ortiz, 2020). Por lo tanto, la respuesta de los machos a los VOCs liberados por frutas de guayaba podría haber evolucionado como una respuesta adaptativa que sincroniza el comportamiento sexual de *A. fraterculus* con la disponibilidad de este hospedante. De hecho, cuando se identificó a las frutas guayaba como una fuente de VOCs estimulantes del comportamiento sexual de *A. fraterculus*, también se probó el impacto de dos hospedantes exóticos (limón y mango) sin encontrar un efecto claro para ninguno de estos (Vera et al., 2013).

Si bien la guayaba es una clara fuente de VOCs estimulantes para los machos de *A. fraterculus*, se desconoce cuál o cuáles son los compuestos responsables de desencadenar este efecto. Recientemente, Ruíz y colaboradores evaluaron el efecto de la exposición a siete aceites esenciales (derivados de hospedantes exóticos y plantas no hospedantes) y dos compuestos aislados presentes en frutos cítricos [(R)-limoneno y citral (mezcla de neral y geranial)] sobre el éxito de apareamiento de los machos de *A. fraterculus* (Ruiz et al., 2021). Estos autores, encontraron que los machos expuestos a un aceite esencial de limón (*Citrus limon*) o a un aceite esencial de moradillo (*Schinus polygama*) incrementaron su éxito copulatorio. Además,

este efecto fue reproducido cuando se expuso a los machos a R-limoneno, el compuesto mayoritario del aceite esencial de limón.

Sin embargo, el R-limoneno también es el compuesto mayoritario del aceite esencial de pomelo (*Citrus paradisi*) y del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*), los cuales no incrementaron el éxito copulatorio de los machos (Ruiz et al., 2021). La abundancia relativa del R-limoneno varía entre las especies de cítricos (González-Mas et al., 2019), y se han informado efectos perjudiciales para moscas de los frutos que fueron expuestas a altas concentraciones de este compuesto (Salvatore et al., 2004; Papachristos et al., 2009; Oviedo et al., 2020; Zeni et al., 2021). Por lo tanto, el efecto del R-limoneno sobre el comportamiento sexual de los machos puede cambiar de acuerdo a su concentración. Además, la respuesta comportamental de los insectos a compuestos volátiles específicos depende frecuentemente del contexto volátil en el que se perciben (Schröder y Hilker, 2008; Beyaert et al., 2010; Bruce y Pickett, 2011; Conchou et al., 2019) y la combinación de ciertos compuestos puede activar respuestas conductuales sinérgicas o antagónicas (Bruce y Pickett, 2011; Conchou et al., 2019). Por lo tanto, tanto la concentración de R-limoneno como la influencia de otros compuestos podría explicar las diferencias en el efecto observado para los distintos aceites cítricos. Por otro lado, el R-limoneno no es uno de los compuestos más abundantes en guayaba ni en moradillo, un arbusto nativo de Sudamérica cuyo aceite esencial presenta una composición química marcadamente diferente al de guayaba (Soares et al., 2007; Jofré Barud, 2018; Ruiz et al., 2021) pero que también funciona como estimulante del comportamiento sexual de *A. fraterculus* (Ruiz et al., 2021). Por lo tanto, es probablemente que además del R-limoneno otros compuestos estén involucrados en el efecto estimulatorio de la EVG sobre el comportamiento sexual de *A. fraterculus*.

El objetivo de este capítulo fue identificar compuestos responsables de la estimulación sexual de los machos tras la EVG. Para esto, se seleccionaron compuestos candidatos a partir de los perfiles químicos de los volátiles liberados por los frutos de guayaba (FG), el aceite esencial de guayaba (AG) y otras fuentes vegetales estimulantes del comportamiento sexual. Luego, se realizaron bioensayos de exposición utilizando distintas concentraciones y mezclas de los compuestos candidatos previamente identificados.

Materiales y Métodos

Frutas, aceite esencial y compuestos sintéticos.

Para realizar la colecta de compuestos volátiles de guayaba se utilizaron los FG colectados en Horco Molle (Tucumán, Argentina) y el AG (Salvia Cosmeceuticals, Delhi, India) con el que se realizaron los tratamientos de exposición descriptos en el capítulo I, II y III. Los compuestos sintéticos R-limoneno (CAS 5989-27-5), β -cariofileno (CAS 87-44-5) y (E-Z) β -ocimeno (CAS 13877-91-3) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, Estados Unidos), mientras que el α -humuleno (CAS 6753-98-6) se adquirió de PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Alemania).

Colecta de compuestos volátiles

Para obtener compuestos volátiles a partir de FG y AG, una pieza de 3 g de FG o 200 μ l de AG (dispensados en un papel de filtro) se colocaron en cámaras de aireación de vidrio (46 cm de largo x 4 cm de diámetro interior). Usando una bomba de aire se empujó a través de las cámaras una corriente (500 ml/min, a 25 °C) de aire limpio (previamente filtrada con carbón activado), durante 4 h (9:30–13:30). Los volátiles de cada cámara se colectaron en filtros conteniendo 20 mg de adsorbente Hayesep Q (Deerfield, Estados Unidos). Para coleccionar compuestos volátiles liberados por machos se llevó a cabo un procedimiento similar. Se colocaron 15 machos maduros en cada cámara de aireación durante el horario en el que los

machos de *A. fraterculus* se encuentran sexualmente activos, con el objetivo de realizar la colecta en el momento del día en estos liberan feromonas (8:30–12:30). Además, se usaron cámaras de aireación vacías como controles negativos de las colectas de FG y volátiles de machos, o cámaras de aireación conteniendo un papel de filtro en el caso de las colectas de AG. Se realizaron diez réplicas para las colectas de cada fuente de volátiles de guayaba (FG y AG) y siete réplicas para las colectas de volátiles de machos llamando. En todos los casos, los compuestos colectados se eluyeron desde los filtros con 200 µl de diclorometano (grado HPCL, Sintorgan, Argentina) y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis químico.

Caracterización química y selección de compuestos candidatos

La caracterización química de los compuestos volátiles liberados por FG y AG, así como por machos llamando se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS, Agilent Technologies, CA, Estados Unidos). Para esto, el cromatógrafo gaseoso, se equipó con una columna capilar HP-5 (30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor; Agilent Technologies, CA, Estados Unidos) y el equipo de espectrometría de masa se configuró en modo de ionización por impacto de electrones (EI) a 70 eV. Un microlitro de cada muestra se inyectó a 240 °C en modo *splitless*, utilizando helio como gas portador (flujo: 0,7 ml/min, presión de entrada: 20,48 kPa). La temperatura del horno se programó con un aumento de 10 °C/min desde una temperatura inicial de 35 °C (isotérmica durante 1 min) hasta una temperatura final de 230 °C. Al finalizar la rampa de temperatura programada, la temperatura final se mantuvo estable durante 15 min. Los compuestos volátiles de FG y AG separados por cromatografía se identificaron comparando, para cada compuesto, su índice de retención relativo (IR) con los reportados por Adams (2007) y su espectro de masa con los proporcionados por la biblioteca de espectros de masas

NIST/EPA/NIH (NIST 08, National Institute of Standards and tecnología, Estados Unidos). Para cada compuesto identificado, se calculó su área máxima y se la relativizó al área total de los compuestos identificados en la muestra a la que pertenecía. Por último, se consideraron como compuestos candidatos aquellos compuestos que estuvieron presentes en los perfiles de volátiles de ambas fuentes de guayaba (FG y AG) y en los perfiles volátiles de otras fuentes vegetales que también estimularon el comportamiento sexual de machos de *A. fraterculus* en trabajos previos: limón y moradillo (Ruiz et al., 2021).

La identidad de los compuestos candidatos fue confirmada mediante la comparación del análisis cromatográfico de los compuestos en la muestra con un análisis cromatográfico realizado con compuestos sintéticos con un alto grado de pureza (entre 95 y 98 %).

Electroantenografía

Para estudiar la respuesta olfativa de machos *A. fraterculus* a cada compuesto candidato, se registró mediante un equipo de electroantenodetección (EAD, Ockenfels Syntech, Alemania) la respuesta eléctrica de cabezas de machos a cinco diluciones (0,01, 0,1, 1, 10, 100 µg/µL) de cada compuesto. Todas las soluciones fueron preparadas utilizando n-hexano (grado HPLC, Sintorgan, Argentina) como solvente. Para cada réplica, la cabeza de un macho de entre 8 y 12 días de edad se disecó y se montó por su base en la punta de un capilar de vidrio lleno con solución *buffer* de fosfatos (PBS 1X, ver contenido en Capítulo II, pág. 69) conteniendo también un electrodo (electrodo de referencia). El extremo distal de una de las antenas se puso en contacto con otro capilar también lleno de PBS 1X conteniendo otro electrodo (electrodo de registro). Ambos electrodos se conectaron desde su base a un amplificador de señal (iDAC2; Syntech, Hilversum, Países Bajos). La antena que unía ambos electrodos fue colocada bajo una corriente de aire húmedo (5 mL/min) y previamente filtrado (carbón

activado), suministrada a través de un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro interno. Para registrar la respuesta eléctrica a cada compuesto testeado, 5 μL de cada dilución se dispensó sobre un papel de filtro (2 cm $\times$ 1 cm; Whatman N1, Whatman, Reino Unido) y se agitó enérgicamente durante 5 segundos, con el fin de evaporar el solvente. Luego, el papel de filtro se colocó dentro de una pipeta Pasteur y la punta de la pipeta se apoyó en un orificio del tubo de vidrio que llevaba la corriente de aire húmedo hacia la antena (Figura IV.1). La muestra de cada dilución se inyectó en la corriente mediante un soplido de aire controlado desde la base de la pipeta. Del mismo modo, una dilución de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de 1-hexanol fue dispensada como un control de respuesta positiva (control positivo) y n-hexano como un control de respuesta al solvente (control de solvente). Las muestras estímulo (cada dilución) fueron dispensadas a cada antena en el siguiente orden: control positivo, control de solvente, diferentes diluciones del compuesto testeado en orden creciente, control de solvente y control positivo. Cada estímulo se aplicó durante 1 segundo y estímulos consecutivos se separaron por 1 minuto para minimizar la adaptación de la respuesta eléctrica de la antena (Kuenen y Baker, 1981). Se realizaron de ocho a diez réplicas para cada compuesto testeado y la respuesta de cada antena se analizó para un único compuesto candidato. Todos los machos utilizados en este ensayo fueron mantenidos en frascos de vidrio de 3L (15 machos por frasco) dentro de incubadoras (Sanyo MLR350, Japón) a 25 °C y alimentados *ad libitum* con agua y una mezcla de azúcar y levadura de cerveza (Calsa, Tucumán, Argentina) (3:1).

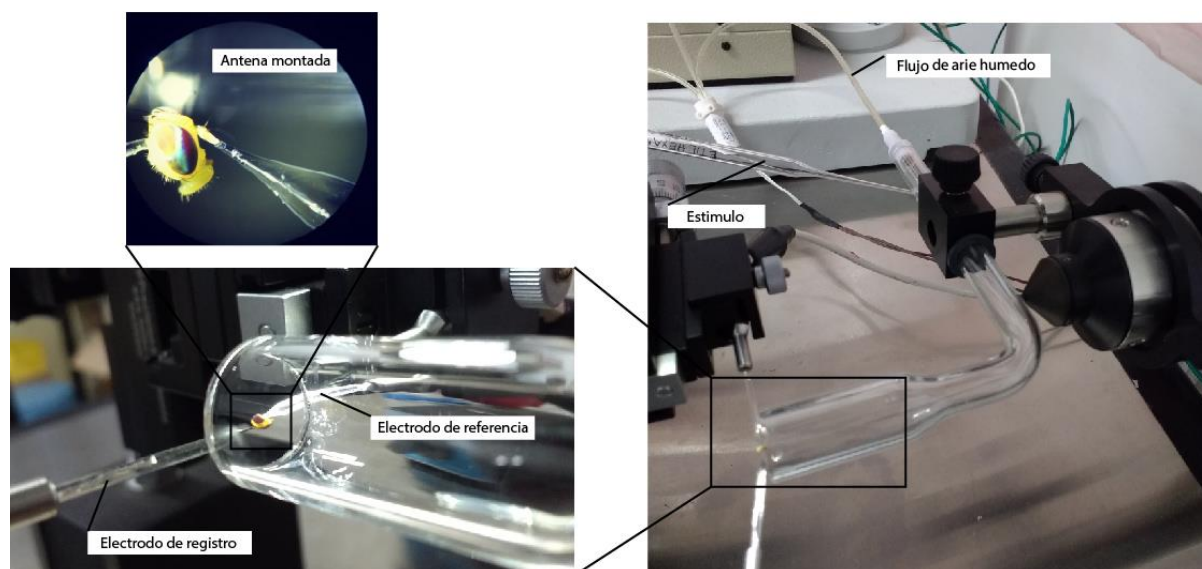


Figura IV.1. Electroantenografía. Antena de un macho de *A. fraterculus* montada en un equipo de electroantenografía para ser estimulada con 1-hexanol (control positivo).

Exposición a compuestos candidatos

Siguiendo la metodología descripta para los ensayos de exposición a volátiles en los capítulos II y III, machos recientemente emergidos fueron separados en grupos de 5 y alimentados *ad libitum* con agua y una mezcla de azúcar y levadura de cerveza (3:1). Para evaluar el efecto de la exposición a los distintos compuestos candidatos, los grupos fueron asignados al azar a una de 4 posibles dosis de exposición para cada uno de los compuestos: 0 (control de solvente), 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para todas las diluciones, n-Hexano (grado HPLC, Sintorgan, Argentina) fue utilizado como solvente. La elección de las dosis de exposición se basó en ensayos piloto en los que se utilizó limoneno, los cuales mostraron que concentraciones más altas este compuesto tienen un efecto perjudicial sobre el comportamiento sexual de los machos.

La exposición fue realizada durante 4 horas diarias (12:00 a 16:00 h) desde el día 10 hasta el día 11 post-emergencia. Para esto, se dispensaron 20 μl de la dilución asignada sobre un papel filtro (2 cm^2), que luego fue colocado en cada frasco dentro de una placa de Petri tapada con

tul (evitando el contacto entre el papel filtro y los insectos). A la edad de 12 días y luego de dos días de exposición, se registró para cada grupo de machos, el índice de llamado (el número de machos que llamando por grupo) cuatro veces durante la hora de mayor actividad sexual (de 8:30 a 9:30). Se realizaron entre 24 y 25 réplicas por dosis para cada compuesto y se utilizaron tres lotes de moscas. Los grupos de machos fueron mantenidos dentro de incubadoras a 25 ± 1 °C y con un fotoperíodo de 12:12 h (luz:oscuridad) durante todo el experimento.

Exposición a mezclas de compuestos candidatos

Para estudiar posibles interacciones entre los compuestos candidatos, se ensayó la exposición a dos mezclas, una conteniendo todos los compuestos candidatos y otra conteniendo solo aquellos compuestos que mostraron estimular el comportamiento de llamado en el ensayo previo. En ambas mezclas, cada compuesto se encontraba a la concentración a la que provocó la mayor estimulación cuando fue ensayado individualmente. La exposición a n-hexano y R-limoneno (10 g/μL) se realizó al mismo tiempo como control de solvente y control positivo, respectivamente. La exposición fue realizada siguiendo la metodología utilizada para la exponer a los machos a diferentes dosis de los compuestos candidatos individuales. Para cada mezcla y control, se realizaron 24 réplicas.

Análisis de datos

Para calcular las áreas relativas de los compuestos identificados por GC-MS se utilizó el programa MassHunter Quantitative Analysis v.B.06.00 (Agilent). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa R v.4.2.1 (R Core Team, 2021). Para la caracterización química de las muestras de compuestos volátiles, la estadística descriptiva se calculó con la función *stat.desc* del paquete *pastecs* (Grosjean y Ibanez, 2018). Para el análisis

de electroantenografía, las señales amplificadas se registraron, calcularon y normalizaron al control positivo utilizando el programa Syntech v.1.2.5 (Syntech, Hilversum, Países Bajos). Para cada compuesto candidato, se comparó la respuesta de EAG normalizada de cada dilución con la respuesta EAG normalizada de n-hexano (control de solvente). Para esto, se utilizó un modelo lineal mixto con una estructura de error gaussiana utilizando la función *lmer* de los paquetes *lme4* y *lmerTest* (Bates et al., 2015; Kuznetsova et al., 2017). El modelo incluyó cada antena como un factor aleatorio y la concentración de la dilución como un factor fijo dentro de cada antena. Para comparar la respuesta olfativa de los machos a los distintos compuestos candidatos, se modeló la respuesta EAG normalizada neta (es decir, la respuesta absoluta menos la respuesta al control de solvente) con la función *nls* del paquete *stats* (R Core Team, 2021). La respuesta de cada antena se describió como una función de la concentración usando la siguiente función cinética de primer orden con dos parámetros: $a \times (1 - \exp(-b \times \text{concentración}))$, donde a representa la respuesta máxima esperada (a una dosis de saturación dada) y b representa la sensibilidad de la respuesta a concentraciones pre-saturantes (Byers, 2013). Como esta función es estrictamente creciente, para aquellas antenas que exhibieron una caída de respuesta a las concentraciones más altas, los últimos valores de respuesta fueron adaptados antes de ajustar el modelo. Es decir, cada uno de los registros de caída se reemplazó con el promedio de la respuesta de caída, de este modo, se eliminó la caída en la respuesta sin afectar la respuesta promedio de la antena. Después de estimar cada parámetro se compararon, entre compuestos candidatos, ambos parámetros por separado usando la función *kruskal.test* del *stats* (R Core Team, 2021). Para estimar los efectos de la exposición a diferentes dosis de cada compuesto candidato o bien a diferentes mezclas de los mismos, se realizó un modelo lineal generalizado con distribución binomial [función de enlace *logit*, usando la función *glmer* del paquete *lme4* (Bates et al., 2015)] para

modelar las medidas repetidas del índice de llamado en función de la dosis o el tipo de mezcla. En cada caso, la dosis o el tipo de mezcla se incluyeron como un factor fijo, mientras que el lote se trató como un factor aleatorio. Para ambos análisis, todas las comparaciones de pares se realizaron utilizando la función *emmeans* del paquete *emmeans* (Lenth, 2020).

Resultados

Caracterización química y selección de compuestos candidatos

Se identificaron un total de 24 y 22 compuestos en las muestras FG y AG, respectivamente. La identidad de estos compuestos y sus áreas relativas se muestran en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Compuestos volátiles de frutos de guayaba (*Psidium guava*) y aceite esencial de guayaba (Salvia Cosmeceuticals, Delhi, India) identificados por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

IR ^a	réplicas ^b	Nombre	CAS	Fórmula	% Área Relativa ± D.E	
					Fruta	Aceite esencial
802	10	(Z)-3-hexenal	6789-80-6	C ₆ H ₁₀ O	25,99 ± 12,05	-
803	10	etil butanoato	105-54-4	C ₆ H ₁₂ O ₂	22,13 ± 8,48	-
	8	no identificado			2,15 ± 1,64	-
851	9	(Z)-2-hexenal	16635-54-4	C ₆ H ₁₀ O	1,41 ± 0,38	-
856	10	(E)-2-hexenal	6728-26-3	C ₆ H ₁₀ O	4,37 ± 1,99	-
881	10	Isopentil acetato	123-92-2	C ₇ H ₁₄ O ₂	0,59 ± 0,44	-
883	10	2-metil butil acetato	624-41-9	C ₇ H ₁₄ O ₂	0,47 ± 0,21	-
	7	no identificado			0,62 ± 0,33	-
912	8	(E,E)-2,4-hexadienal	142-83-6	C ₆ H ₈ O	0,80 ± 0,24	-
929	10	α-felandreno	99-83-2	C ₁₀ H ₁₆	-	0,5 ± 0,09
	5	no identificado			0,19 ± 0,06	-
935	10	α-pineno	7785-70-8	C ₁₀ H ₁₆	-	4,34 ± 1,05
950	10	camfeno	79-92-5	C ₁₀ H ₁₆	-	0,63 ± 0,12
977	10	β-pineno	127-91-3	C ₁₀ H ₁₆	-	3,22 ± 0,44
992	10	β-mirceno	123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	-	1,99 ± 0,22
	10	no identificado			-	0,33 ± 0,07
1001	10	etil hexanoato	123-66-0	C ₈ H ₁₆ O ₂	2,01 ± 0,62	-
	10	no identificado			-	1,29 ± 0,07
	10	no identificado			1,34 ± 0,94	-
1009	10	(E)-3- acetato de hexenilo	3681-82-1	C ₈ H ₁₄ O ₂	5,43 ± 3,06	-
1010	10	3-careno	13466-78-9	C ₁₀ H ₁₆	-	1,82 ± 0,09

1017	10	acetate de exilo	142-92-7	C ₈ H ₁₆ O ₂	1,20 ± 0,52	-
1017	10	α-terpineno	99-86-5	C ₁₀ H ₁₆	-	5,87 ± 0,38
1022	9	menteno	5502-88-5	C ₁₀ H ₁₈	-	0,23 ± 0,03
1026	10	o-cimeno	99-87-6	C ₁₀ H ₁₄	-	6,53 ± 0,52
1030	10, 10	limoneno*	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	5,58 ± 5,54	67,48 ± 0,92
1041	10, 10	(Z)-β-ocimeno*	3779-61-1	C ₁₀ H ₁₆	0,71 ± 0,62	0,27 ± 0,05
1052	9, 10	(E)-β-ocimeno*	3338-55-4	C ₁₀ H ₁₆	0,35 ± 0,27	0,08 ± 0,02
1061	10	γ-terpineno	99-85-4	C ₁₀ H ₁₆	-	1,94 ± 0,29
	10	no identificado			-	0,06 ± 0,02
1089	10	terpinoleno	586-62-9	C ₁₀ H ₁₆	-	1,85 ± 0,29
1133	7, 10	aloocimeno	7216-56-0	C ₁₀ H ₁₆	0,44 ± 0,38	0,12 ± 0,03
1159	10	mentona	14073-97-3	C ₁₀ H ₁₈ O	2,80 ± 3,71	0,12 ± 0,03
	5	etil benzoato	93-89-0	C ₉ H ₁₀ O ₂	0,26 ± 0,16	-
1190	7	(Z)-3-hexiletil butirato	16491-36-4	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0,42 ± 0,34	-
	10	no identificado			-	0,38 ± 0,14
	8	no identificado			-	0,05 ± 0,02
1249	10	carvona	6485-40-1	C ₁₀ H ₁₄ O	-	0,13 ± 0,06
	6	No identificado			-	0,02 ± 0,01
1262	7	feniletil acetato	103-45-7	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	0,38 ± 0,28	-
	7	no identificado			-	0,04 ± 0,02
	6	no identificado			-	0,08 ± 0,04
1289	9	estragol	140-67-0	C ₁₀ H ₁₂ O	-	0,09 ± 0,03
	7	no identificado			-	0,03 ± 0,01
1367	10	acetato de nerilo	141-12-8	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	-	0,16 ± 0,08
1375	10	3-fenilpropil acetato	122-72-5	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	9,98 ± 4,46	-
1381	8	α-copeno	3856-25-5	C ₁₅ H ₂₄	-	0,02 ± 0,01
	8	no identificado			-	0,02 ± 0,01
1428	10, 10	β-cariofileno*	87-44-5	C ₁₅ H ₂₄	2,96 ± 3,14	0,3 ± 0,12

1463	10, 10	α -humuleno*	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄	6,04 $\pm$ 6,27	0,08 $\pm$ 0,04
1484	9	γ -selineno	515-17-3	C ₁₅ H ₂₄	0,18 $\pm$ 0,14	-
1496	10	β -selineno	17066-67-0	C ₁₅ H ₂₄	1,35 $\pm$ 1,22	-
1504	10	α -selineno	473-13-2	C ₁₅ H ₂₄	1,36 $\pm$ 1,54	-

^a Índice de retención calculado sobre tiempos de retención en una columna capilar HP5-MS.

^b Cantidad de réplicas en las cuales el compuesto fue encontrado (fruta, aceite esencial)

^c Área relativa al área total de compuestos identificados en la muestra.

* Compuestos identificados por comparación con estándares sintéticos [R-limoneno, (E/Z)- β -ocimeno, β -cariofileno, α -humuleno].

Se encontraron 7 compuestos comunes entre los perfiles de volátiles de FG y AG. Cinco de ellos, fueron también encontrados en otras fuentes de volátiles vegetales que estimularon el éxito de apareamiento de *A. fraterculus* (Ruiz et al., 2014, 2021; Jofré Barud, 2018) y, por lo tanto, fueron considerados como compuestos candidatos: limoneno, E- β -ocimeno, Z- β -ocimeno β -cariofileno y α -humuleno (Figura IV.2). Además, el E- β -ocimeno fue encontrado entre los cinco compuestos más abundantes entre los volátiles liberados por machos llamando (% área relativa $\pm$ DE = 10,11 $\pm$ 0,45). El resto de los compuestos candidatos, no fueron identificados entre los volátiles de machos (β -cariofileno y α -humuleno) o bien se encontraron en cantidades traza (limoneno, área relativa < 0,1) (Tabla IV.2, Figura IV.2). Aunque la columna cromatográfica utilizada para identificar los volátiles liberados por guayaba no es idónea para discriminar los isómeros ópticos de limoneno (R y S), la detección de limoneno se consideró indicativa de la presencia de R-limoneno, ya que sólo la presencia de este isómero se ha informado previamente en aceites de guayaba y otras especies de mirtáceas (Siddique et al., 2015; Hassan et al., 2020).

Tabla IV.2. Compuestos volátiles liberados por machos de *Anastrepha fraterculus* sp.1 identificados por GC-MS.

I.R ^a	Muestras ^b	Nombre	CAS	Fórmula	% Area Relativa ^c ± D. E
1030	7	limoneno*	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	0.07 ± 0.03
1041	7	(Z)-β-ocimeno*	3779-61-1	C ₁₀ H ₁₆	0.22 ± 0.03
1052	7	(E)-β-ocimeno*	3338-55-4	C ₁₀ H ₁₆	10.11 ± 1.19
1105	7	nonanal	124-19-6	C ₉ H ₁₈ O	0.07 ± 0.06
1136	7	aloocimeno	7216-56-0	C ₁₀ H ₁₆	0.12 ± 0.02
-	7	no identificado	-	-	0.30 ± 0.09
1498	7	(Z,E)- α-farneseno	26560-14-5	C ₁₅ H ₂₄	4.62 ± 1.24
1513	7	(E,E)- α-farneseno	502-61-4	C ₁₅ H ₂₄	67.66 ± 3.89
1601	7	anastrefina	86003-24-9	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	5.64 ± 1.51
1614	7	epianastrefina	87248-73-5	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	9.09 ± 3.96
-	7	no identificado	-	-	0.12 ± 0.02
-	7	no identificado	-	-	1.72 ± 0.46
-	7	no identificado	-	-	0.11 ± 0.02
-	7	no identificado	-	-	0.12 ± 0.03

^a Índice de retención calculado sobre tiempos de retención en una columna capilar HP5-MS.

^b Cantidad de réplicas en las cuales el compuesto fue encontrado (fruta, aceite esencial)

^c Área relativa al área total de compuestos identificados en la muestra

*Compuestos identificados por comparación con compuestos sintéticos estándar

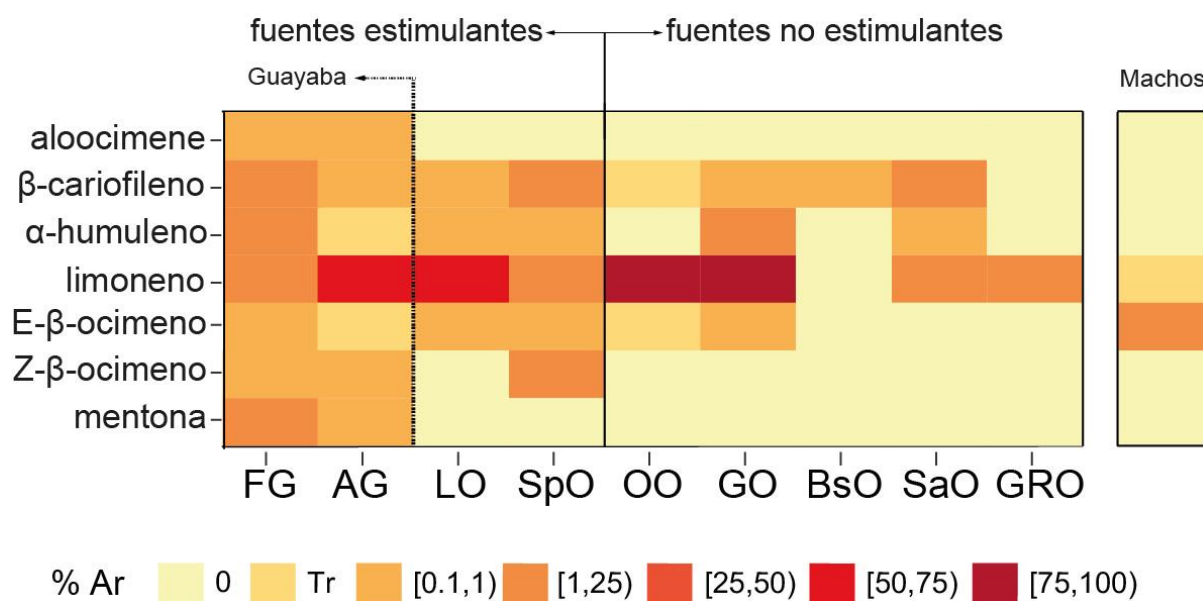


Figura IV.2. Abundancia relativa de los siete compuestos compartidos por frutos y aceite de guayaba en diferentes fuentes vegetales. Algunas de las fuentes [frutos de *Psidium guajava* (FG), aceite de *Psidium guajava* (AG), aceite de *Citrus limon* (LO), aceite de *Schinus polygama* (SpO)] son conocidas por estimular el comportamiento sexual de *A. fraterculus* (Vera et al., 2013; Bachmann et al., 2015; Ruiz et al., 2021; Capítulo I). Para el resto de las fuentes vegetales [aceite de *Citrus sinensis* (OO), aceite de *Citrus paradisi* (GO), aceite de *Baccharis spartioides* (BsO), aceite de *Schinus areira* (SaO) y aceite de *Zingiber officinale* (GRO)] no se encontró efecto (Ruiz et al., 2021). Los volátiles liberados por los machos de *A. fraterculus* fueron colectados de machos de 11 días de edad durante el cortejo (8:30 a 12:00). Los datos de abundancia relativa (Ar) corresponden a las áreas de cada compuesto relativas al área total de todos los compuestos identificados mediante el análisis cromatográfico (GC-MS) de cada fuente vegetal. Los datos de Ar para FG, AG y machos de *A. fraterculus* fueron generados en el presente estudio, mientras que los datos correspondientes al resto de las fuentes vegetales fueron tomados de Ruiz et al. (2015) y Jofré Barud (2018). Ar < 0.1 % fueron consideradas como trazas (Tr).

Electroantenografía

Todos los compuestos candidatos evaluados por electroantenografía (R-limoneno, (E/Z)-β-ocimeno, β-cariofileno y α-humuleno) fueron detectados por la antena de machos adultos maduros (Figura 4.2). La respuesta olfativa de los machos a estos compuestos fue más fuerte que para los controles de solvente en al menos 3 de las 5 dosis testeadas ($p < 0,01$). Sin embargo, ni la respuesta desencadenada a dosis de saturación (parámetro a) ni la sensibilidad de la respuesta a concentraciones pre-saturantes (parámetro b) difirieron entre los compuestos candidatos ($p = 0,713$ y $0,142$, respectivamente).

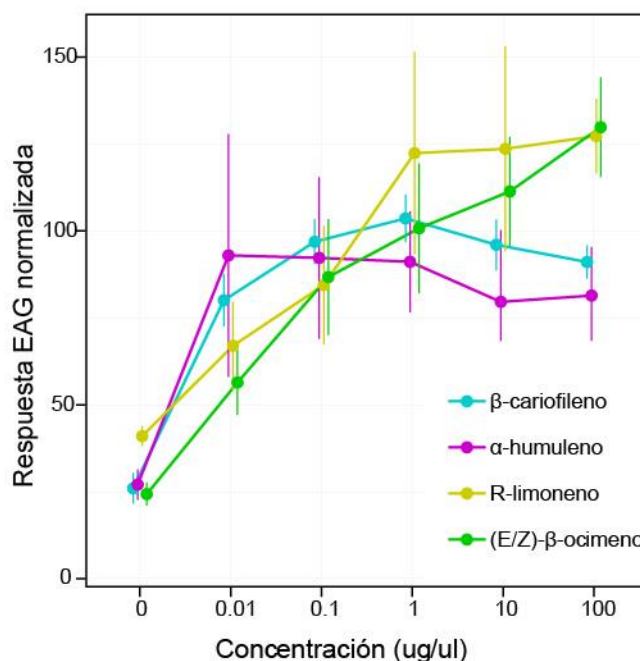


Figura IV.3. Respuesta antenal de los machos de *A. fraterculus* a los compuestos candidatos. Respuestas electroantenográficas (EAG) normalizadas (media $\pm$ error estándar) a cinco concentraciones de cada compuesto candidato: R-limoneno (amarillo), (E/Z)-β-ocimeno (verde), β-cariofileno (cian), y α-humuleno (magenta). Las respuestas para dosis de 0 µg/µL corresponden a n-hexano, el solvente utilizado para preparar las diluciones. Todas las respuestas fueron normalizadas a la respuesta EAG a 1 µg/µL de 1-hexanol.

Exposición a compuestos candidatos

Los machos expuestos a (E/Z)-β-ocimeno y R-limoneno presentaron un mayor índice de llamado que los machos control cuando fueron expuestos a 1 y 10 µg/µL, respectivamente.

Para el R-limoneno, el *odds* del índice de llamado para machos expuestos a 10 µg/µL fue en promedio 2,65 veces mayor ($Z_{\text{ratio}} = 5,16$, $p < 0,0001$) que para machos control y 4,06 veces mayor ($Z_{\text{ratio}} = 6,40$, $p < 0,0001$) que para machos expuestos a 100 µg/µL (Figura IV.4, A).

Además, el R-limoneno mostró un efecto negativo sobre el índice de llamado cuando los machos fueron expuestos directamente al estándar (~ 800 µg/µL). Para dicho caso, el *odds* del índice de llamado fue en promedio 2,22 veces menor ($Z_{\text{ratio}} = 3,36$; $p = 0,001$) para los machos expuestos que para los machos control (Figura IV.4, A).

Por otro lado, cuando los machos fueron expuestos a (E/Z)-β-ocimeno, el *odds* del índice de llamado fue en promedio 2 veces mayor ($Z_{\text{ratio}} = 4,63$; $p < 0,0001$) para machos expuestos a 1

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ que para machos control y 2,60 veces mayor ($Z_{\text{ratio}} = 5,39$; $p < 0,0001$) que para machos expuestos a $100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura IV.4, B). Por último, la exposición a β -cariofileno y a α -humuleno no afectó el índice de llamado de los machos a ninguna dosis testada ($\text{Chisq} = 5,42$; $p = 0,143$; $\text{Chisq} = 1,07$; $p = 0,785$, respectivamente) (Figura IV.4, C).

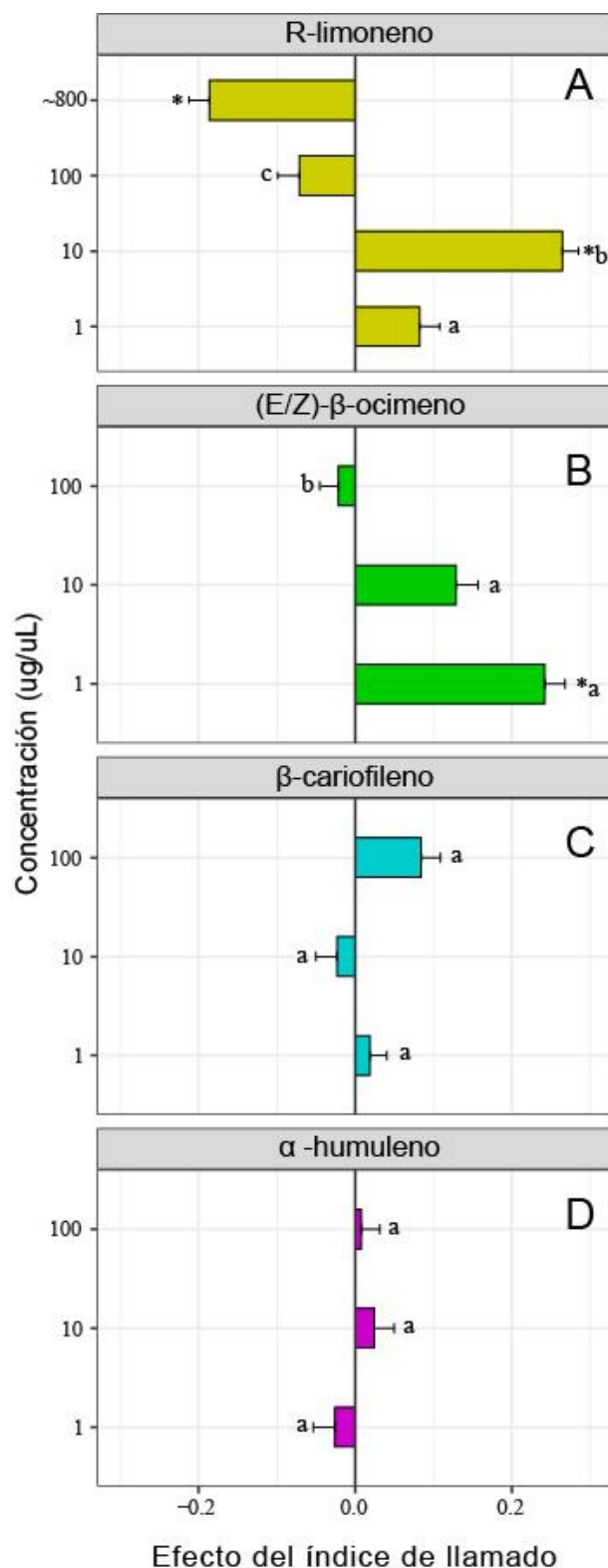


Figura IV.4. Efecto dosis-dependiente de los compuestos candidatos sobre el comportamiento de llamado de *A. fraterculus*. Cada barra representa el promedio ($\pm$ error estándar) del efecto de la exposición a diferentes dosis de (A) R-limoneno, (B) (E/Z)- β -ocimeno, (C) β -cariofileno, y (D) α -humuleno sobre el índice de llamado de los machos (diferencia entre el índice de llamado de machos expuestos y machos control). Los machos control fueron expuestos a n-hexano. Asteriscos indican diferencias significativas entre machos expuestos y machos control ($p < 0,05$), mientras que las letras indican diferencias significativas entre dosis ($p < 0,05$), excepto para R-limoneno a $\sim 800 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ el cual fue un experimento separado.

Exposición a mezclas de compuestos candidatos

Los machos expuestos a mezclas de los compuestos candidatos presentaron mayor índice de llamado que los machos control. El *odds* del índice de llamado de los machos expuestos a una mezcla integrada por todos los compuestos candidatos, fue 1,6 veces mayor que en los machos no expuestos ($Z_{\text{ratio}} = 4,49$; $p < 0,0001$). Sin embargo, no difirió del alcanzado por la exposición a $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de R-limoneno ($Z_{\text{ratio}} = 1,33$; $p = 0,55$), que fue en promedio 1,06 veces mayor que el de machos control ($Z_{\text{ratio}} = 4,49$; $p < 0,0001$). El máximo índice de llamado se encontró para machos expuestos a la mezcla de R-limoneno y (E/Z)- β -ocimeno. Los machos expuestos a esta mezcla mostraron, en promedio, un *odds* del índice de llamado 4,24 veces mayor ($Z_{\text{ratio}} = 8,35$; $p < 0,0001$) que el de los machos control y 1,5 veces mayor ($Z_{\text{ratio}} = 4,51$; $p < 0,0001$) que el de los machos expuestos a $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de R-limoneno (Figura IV.5).

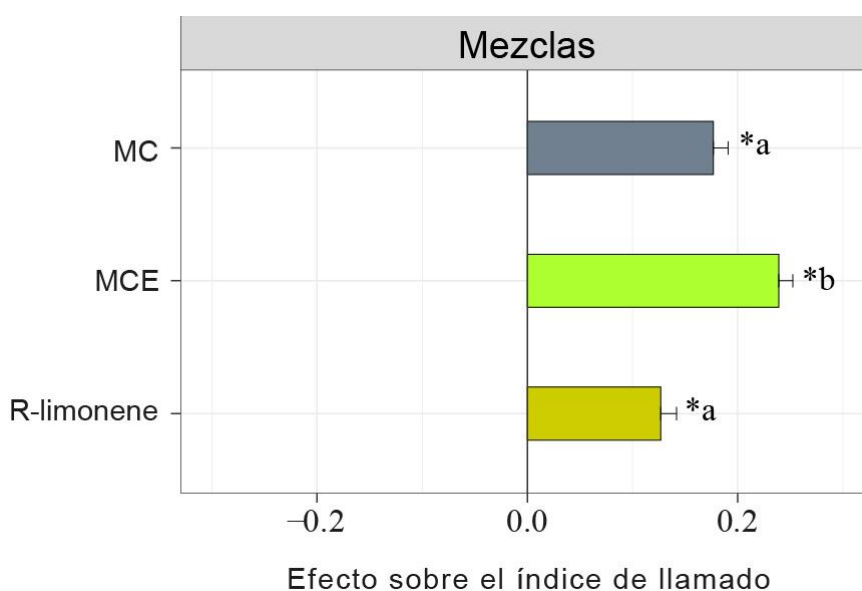


Figura IV.5. Efecto de mezclas de compuestos candidatos sobre el comportamiento sexual de *A. fraterculus*. Cada barra representa el promedio ($\pm$ error estándar) del efecto de la exposición a una mezcla de todos los compuestos candidatos (MC), una mezcla de los compuestos candidatos estimulantes (MCE) y R-limoneno sobre el índice de llamado de los machos (diferencia entre el índice de llamado de machos expuestos y machos control). La mezcla de compuestos candidatos estuvo compuesta por R-limoneno (E/Z)- β -ocimeno, β -cariofileno, y α -humuleno. La mezcla de compuestos estimulantes estuvo compuesta por R-limoneno y (E/Z)- β -ocimeno. Los machos control fueron expuestos a n-hexano. Asteriscos indican diferencias significativas entre machos expuestos y machos control ($p < 0,05$), mientras que las letras indican diferencias significativas entre dosis ($p < 0,05$), excepto para R-limoneno a $\sim 800 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ el cual fue un experimento separado.

Discusión

En este capítulo, se exploraron los perfiles químicos de distintas fuentes de volátiles de guayaba (FG y AG) con el objetivo de identificar compuestos específicos responsables de estimular el comportamiento sexual de los machos de *A. fraterculus*. Como primer paso, se seleccionaron cinco compuestos candidatos (α -humuleno, β -cariofileno, E- β -ocimeno, Z- β -ocimeno y R-limoneno), los cuales no solo estaban presentes en los perfiles químicos de FG y AG, sino también en los perfiles de otras fuentes volátiles previamente descriptas como estimulantes del comportamiento sexual de machos de *A. fraterculus* (LO y SpO). Además, al explorar la capacidad de los machos para detectar estos compuestos, los resultados revelaron que todos los compuestos candidatos ensayados evocan una respuesta en las antenas de los machos. Sin embargo, solo R-limoneno y (E/Z)- β -ocimeno estimularon el comportamiento de llamado de los machos durante los bioensayos de exposición, siendo la exposición a una mezcla de estos el tratamiento que desencadenó el mayor índice de llamado.

Los perfiles de compuestos volátiles identificados a partir de FG y AG fueron notablemente diferentes. Sólo 7 de los 39 compuestos eran compartidos por ambas fuentes con abundancias relativas muy diferentes entre FG y AG. Si bien el AG se origina a partir de FG, las diferencias pueden ser explicadas si tenemos en cuenta que los aceites esenciales son el resultado de un proceso de extracción que nos otorga una perspectiva parcial de la mezcla de volátiles que libera la planta (Figueiredo, 2017). Además, la guayaba empleada para obtener el aceite esencial comercial (Nueva Delhi, India) y las frutas de guayaba (recolectadas en Horco Molle, Tucumán, Argentina) utilizadas en este estudio probablemente pertenezcan a diferentes quimiotipos¹³ de *P. guajava* (Figueiredo, 2017; de Souza et al., 2018). Aunque así

¹³ Plantas de la misma especie que parecen idénticas pero varían en sus componentes químicos.

fuera, ambas fuentes de guayaba analizadas en este capítulo fueron las mismas que se utilizaron en el capítulo I durante los bioensayos de exposición. Es decir, que se analizaron químicamente las mismas fuentes de guayaba que previamente fueron encontradas como estimulantes del comportamiento de llamado de *A. fraterculus*. Sin embargo, cabe señalar una limitación experimental para la identificación de compuestos comunes. Una misma muestra de compuestos volátiles puede producir diferentes perfiles químicos dependiendo de cuál fue el método empleado para la colecta de los mismos (Rizzolo et al., 1992). Por lo tanto, FG y AG podrían compartir, además de los compuestos ya mencionados, otros compuestos que no pudieron ser detectados mediante la metodología de muestreo utilizada en este capítulo.

El efecto de la exposición a R-limoneno sobre el comportamiento de llamado de los machos observado en este capítulo, coincide con lo previamente publicado por Ruiz y colaboradores. Estos autores mostraron que machos de *A. fraterculus* expuestos a R-limoneno aumentaron su éxito de apareamiento en relación a machos no expuestos (Ruiz et al., 2021). Además, este compuesto es el volátil más abundante en aceites esenciales cítricos capaces de estimular la competitividad sexual de *A. fraterculus*, *A. ludens* y *C. capitata* (Shelly et al., 2004a; Shelly, 2009; Morató et al., 2015; Kouloussis et al., 2017; Ruiz et al., 2021), aunque la exposición de los machos de *C. capitata* a R-limoneno como compuesto puro no afectó su éxito de apareamiento (Juan-Blasco et al., 2013). Por otro lado, el E- β -ocimeno y el Z- β -ocimeno fueron encontrados entre los compuestos liberados por machos de *A. fraterculus* durante su actividad sexual (Břízová et al., 2013; Bachmann et al., 2015). Sin embargo, aunque el E- β -ocimeno se utilizó anteriormente como parte de una mezcla que incrementó el éxito de apareamiento de *A. fraterculus* (Bachmann et al., 2015), este compuesto no había sido hasta ahora implicado en la estimulación del comportamiento de llamado. Para algunos

compuestos, los insectos pueden responder de manera diferente a sus enantiómeros¹⁴ (Flath et al., 1994; Giatropoulos et al., 2012; Borrego et al., 2021). En este capítulo, el efecto del β -ocimeno se testeó usando una mezcla de isómeros (E y Z). Por ello, se necesitarán estudios adicionales para determinar el aporte de cada isómero al efecto estimulador probado para su mezcla. Los compuestos candidatos restantes, β -cariofileno y α -humuleno, no afectaron el comportamiento de llamado de los machos de *A. fraterculus* cuando se los utilizó como fuente de exposición. El potencial del β -cariofileno para estimular el comportamiento sexual de moscas de los frutos no se había evaluado antes, a pesar de que este compuesto es un atrayente para varias especies de esta familia (Kamiji et al., 2018; Wee et al., 2018a; Jaleel et al., 2019). En el caso del α -humuleno, previamente se describió un efecto negativo sobre el éxito de apareamiento de machos de *C. capitata* tras un tratamiento de exposición (Shelly y Nishimoto, 2015).

El efecto de R-limoneno y (E/Z)- β -ocimeno sobre el comportamiento de llamado de los machos fue dependiente de la dosis de exposición. En el caso de R-limoneno, la exposición a este compuesto estimuló el comportamiento de llamado cuando se utilizó a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que no se observó efecto al utilizar una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Además, se observó un efecto perjudicial del R-limoneno sobre el comportamiento de llamado cuando fue dispensado puro ($\sim 800 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). En discrepancia con este resultado, Ruiz y colaboradores encontraron que los machos expuestos a R-limoneno puro presentaron mayor éxito de apareamiento que machos no expuestos (Ruiz et al., 2021). Sin embargo, mientras que Ruiz y colaboradores expusieron a los machos durante una hora, en este capítulo, el tratamiento de exposición duró cuatro horas. Por lo tanto, la respuesta de

¹⁴ También llamados isómeros ópticos, son una clase de estereoisómeros tales que en la pareja de compuestos la molécula de uno es imagen especular de la molécula del otro y no son superponibles.

los machos al tratamiento de exposición se encontraría modulada tanto por la concentración como por el tiempo de exposición. En estudios anteriores se informaron efectos tóxicos de la exposición a limoneno (o aceites esenciales con altas proporciones de este compuesto) sobre la supervivencia, la emergencia y la fecundidad de varias especies de tefrítidos, incluida *A. fraterculus* (Salvatore et al., 2004; Papachristos et al., 2009; Ruiz et al., 2014; Papanastasiou et al., 2017; Oviedo et al., 2018, 2020). Además, cuando Ruiz y colaboradores evaluaron el efecto de tres aceites cítricos que contienen R- limoneno (limón, naranja y pomelo) sobre el éxito de apareamiento de *A. fraterculus*, solo la exposición al aceite esencial con menor concentración de este compuesto (limón) fue capaz de estimular a los machos (Ruiz et al., 2015, 2021; González-Mas et al., 2019). Por otro lado, la exposición a (E/Z)- β -ocimeno no redujo el índice de llamado de los machos a ninguna de las concentraciones evaluadas, aunque concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ no fueron testeadas para este compuesto. No obstante, el (E/Z)- β -ocimeno solo estimuló el comportamiento de llamado cuando se utilizó a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (la menor concentración probada en este estudio), mostrando, al igual que el R-limoneno, un efecto dosis-dependiente. De manera similar a lo observado para (E/Z)- β -ocimeno sobre *A. fraterculus*, el efecto estimulante de la exposición a GRO sobre el éxito de apareamiento de los machos de *C. capitata*, se maximiza a bajas concentraciones (Paranhos et al., 2013).

Respecto a las mezclas de compuestos candidatos en este capítulo se probaron dos mezclas: una conteniendo solo los compuestos que resultaron estimulantes del comportamiento de llamado (es decir, R-limoneno y E/Z- β -ocimeno) y otra conteniendo todos los compuestos candidatos (es decir, R-limoneno, E/Z- β -ocimeno, β -cariofileno y α -humuleno). Aunque la exposición de los machos a ambas mezclas provocó la estimulación del comportamiento sexual de los machos, el efecto fue mayor cuando se utilizó la mezcla que contenía solamente

los compuestos estimulantes (R-limoneno y E/Z- β -ocimeno). Entonces, el R-limoneno y el E/Z- β -ocimeno parecen tener efectos parcialmente aditivos sobre el comportamiento de machos, mientras que el β -cariofileno y el α -humuleno podrían estar interactuando de manera antagónica con los compuestos estimulantes. Anteriormente, Bachmann y colaboradores también lograron estimular sexualmente a machos de *A. fraterculus* mediante la exposición a una mezcla de compuestos sintéticos (que incluía al R-limoneno, E- β -ocimeno y α -humuleno entre otros) (Bachmann et al., 2015). Mientras que estos autores, utilizaron la misma concentración para todos los compuestos de la mezcla, en este capítulo, para cada mezcla de compuestos, se utilizó la concentración a la que cada compuesto mostró el mayor efecto estimulante cuando se lo probó por separado. Sin embargo, la abundancia relativa de los compuestos que evaluamos en las mezclas no representa la abundancia relativa de cada compuesto en las muestras volátiles de frutos de guayaba, a la que los machos podrían estar expuestos en la naturaleza. Además, los insectos pueden interpretar aromas con distintas proporciones de los mismos compuestos como ‘mensajes’ diferentes (Conchou et al., 2019). Por lo tanto, explorar combinaciones de estos compuestos en las proporciones que se encuentran en la naturaleza, podría ayudar a comprender más profundamente la relevancia ecológica de los mismos.

Anastrepha fraterculus es un complejo de especies crípticas; y distintas poblaciones difieren en la composición de los volátiles liberados por los machos durante el cortejo (Lima et al., 2001; Cáceres et al., 2009; Břízová et al., 2013; Vaníčková et al., 2015). En este capítulo, se confirmó la presencia de E- β -ocimeno como uno de los compuestos mayoritarios de la mezcla de volátiles liberada por machos de *A. fraterculus* sp. 1 (Cáceres et al., 2009; Bachmann, 2016). Asimismo, el limoneno fue encontrado en esta mezcla como un compuesto minoritario (sólo se encontraron cantidades traza de este compuesto.) Sin embargo, Břízová y

colaboradores encontraron proporciones mayores de limoneno cuando analizaron los volátiles liberados por machos del mismo morfotipo de *A. fraterculus* (morfotipo Brasil 1 o sp. 1 (Břízová et al., 2013). Esta discrepancia podría ser consecuencia de las diferentes condiciones de cría y alimentación a las que los machos estuvieron sometidos en ambos trabajos, tal como sucede para machos de *C. capitata* criados en diferentes condiciones (Merli et al., 2018). Los resultados de este capítulo mostraron que tanto R-limoneno como E/Z- β -ocimeno fueron capaces de evocar una respuesta eléctrica en las antenas de machos adultos maduros. Curiosamente, el E- β -ocimeno, pero no el limoneno, desencadenaron una respuesta eléctrica en las antenas de hembras vírgenes maduras, cuando fueron expuestas a una mezcla de volátiles liberada por machos llamando (Bachmann, 2016). Este resultado, sugiere que el E- β -ocimeno, pero no el limoneno, podría estar actuando como una feromona sexual. En el sistema de apareamiento de esta especie, los machos se congregan cerca o sobre árboles hospederos para atraer a las hembras, formando leks. En este sentido, el limoneno podría funcionar como una señal de agregación para los machos o bien podría aumentar la atracción de las hembras a la feromona sexual. De cualquier modo, para dilucidar el rol de estos compuestos durante la actividad sexual de *A. fraterculus* se requieren estudios comportamentales que involucren tanto a machos como a hembras.

Los machos de *A. ludens* y *A. suspensa* también liberan limoneno y β -ocimeno durante el cortejo, aunque lo hacen en diferentes proporciones. De hecho, esta diferencia fue propuesta como un mecanismo de aislamiento reproductivo pre-copulatorio que podría haber evolucionado durante las primeras etapas de la especiación (Rocca et al., 1992). Contrariamente a los machos de *A. fraterculus* sp. 1, los machos de *A. fraterculus* sp. 3 liberan, durante el cortejo, limoneno como compuesto mayoritario y β -ocimeno como un compuesto minoritario (Břízová et al., 2013; Milet-Pinheiro et al., 2015). Además, las antenas de hembras

vírgenes de *A. fraterculus* sp. 3 sí evocaron una respuesta eléctrica cuando fueron estimuladas con el limoneno proveniente de muestras volátiles de machos llamando (Milet-Pinheiro et al., 2015). En este sentido, la cantidad relativa de limoneno y β -ocimeno en la mezcla de volátiles liberados por los machos, también podría estar actuando como una barrera reproductiva entre distintos morfotipos de *A. fraterculus*. Además, las hembras de muchas especies de tefrítidos se ven mayormente atraídas hacia frutos maduros que a frutos inmaduros, prefiriendo los primeros para la oviposición (Cunningham et al., 2016; Cortés-Martínez et al., 2021). Durante el proceso de maduración, los frutos de guayaba incrementan la liberación de limoneno y β -ocimeno (Soares et al., 2007). Por lo tanto, la estimulación sexual de los machos tras la exposición a estos compuestos podría constituir un mecanismo útil para sincronizar la inversión energética en actividades sexuales (como el cortejo) con la disponibilidad de hospederos. No obstante, se necesitan estudios adicionales para poner a prueba estas hipótesis y dilucidar cuáles son los componentes genéticos y ambientales que determinan la composición de los volátiles liberados por los machos.

Conclusiones Generales



Perspectiva aplicada

La exposición a volátiles de guayaba ha demostrado ser un tratamiento útil para incrementar la frecuencia de cortejo y el éxito de apareamiento de los machos de *A. fraterculus*. Además, las hembras que copulan con estos machos presentan mayor fecundidad. Por esto, se ha sugerido que, en un contexto de control poblacional mediante la técnica de insecto estéril (TIE), el tratamiento de EVG representaría una herramienta útil para estimular a los machos estériles de *A. fraterculus* antes de su liberación al campo. Sin embargo, la factibilidad de implementar este tratamiento en dicho contexto depende de numerosos factores que, hasta ahora, no habían sido estudiados. A lo largo de esta tesis se ha profundizado en el estudio de factores que pueden modular la estimulación sexual de *A. fraterculus* mediada por EVG, contribuyendo así, a conocer la factibilidad de su implementación en un contexto de cría masiva.

En primer lugar, teniendo en cuenta que el uso de frutas como fuente de volátiles de guayaba podría representar dificultades logísticas dentro de una biofábrica, en el capítulo I, se analizó la posibilidad de utilizar un aceite esencial comercial de guayaba (AG) como fuente alternativa. Además, se investigó si la EVG es, también, un tratamiento útil para acelerar la maduración sexual de los machos. Acelerar la maduración sexual de los machos, o estimular su comportamiento sexual mediante un tratamiento que pueda realizarse justo después de la emergencia, podría reducir significativamente el costo de mantenimiento de machos adultos. Por esto, en el capítulo I de esta tesis, también se investigó cuál es el rango etario más adecuado para exponer a los machos. Además, se investigó si el tratamiento de EVG podría representar una disminución en la capacidad de los machos para resistir condiciones de hambre (a las que podrían verse sometidos luego de su liberación a campo).

Adicionalmente en el capítulo III, se evaluó la influencia de la dieta suministrada a los machos adultos sobre el efecto estimulador de la EVG.

Por un lado, los resultados obtenidos muestran que es posible estimular el comportamiento sexual de los machos utilizando un AG como fuente de volátiles y que este tratamiento no impacta sobre la resistencia al hambre de los machos. Sin embargo, también se encontró que el tratamiento de EVG no afecta el tiempo requerido por los machos hasta su maduración sexual, así como tampoco fue efectivo para estimular el comportamiento sexual de éstos cuando fueron expuestos a edades inmaduras. Si bien esto aumentaría los costos de mantenimiento, una liberación temprana implica que los machos alcancen su madurez en el campo, lo que aumenta los riesgos de muerte (por ejemplo, por depredación o por hambre) antes de que sean capaces de copular. De hecho, los resultados presentados en el capítulo I indican que el 50 % de los machos adultos (alimentados con una dieta de azúcar y levadura de cerveza) mueren luego de tres días sin alimento. Así, el mantenimiento de machos adultos por lo menos hasta su edad de madurez sexual (aproximadamente 6 días post-emergencia) debería ser considerado. Luego, y teniendo en cuenta que la estimulación sexual de los machos por EVG se evidenció a partir del día 9 post-emergencia, se requerirían 3 días adicionales para liberar machos maduros y estimulados sexualmente.

Por otro lado, en el capítulo III, se ha evaluado el efecto de la exposición sobre machos alimentados con dietas de diferentes composiciones. Estos resultados mostraron que los machos alimentados con una dieta proteica de alta calidad, pero no tratados con EVG (HY, azúcar e hidrolizado de levadura, 12:1) presentan un mayor índice de llamado que aquellos alimentados con una dieta proteica de baja calidad (BY, azúcar y levadura de cerveza, 3:1) y tratados por EVG. Además, el tratamiento por EVG no afectó el comportamiento sexual de los machos alimentados con HY. Es decir, si los machos fueran alimentados con HY en un contexto

de cría masiva, no se requeriría un tratamiento extra (EVG) para estimular su comportamiento sexual y se alcanzaría un mayor nivel de estimulación. Además, al no requerir un tratamiento por EVG, los machos alimentados con HY podrían ser liberados 3 días antes (respecto a machos alimentados con BY y tratados con EVG). Adicionalmente, cuando en el capítulo III se estudió el consumo de reservas energéticas durante el tratamiento por EVG (sobre machos alimentados con BY), se observó que el incremento del índice de llamado se encuentra sostenido por un mayor consumo de carbohidratos y triglicéridos. Además, el efecto estimulador de la EVG sobre el comportamiento de llamado, se invirtió cuando los machos no pudieron volver a alimentarse. Es decir, según estos resultados, la liberación de machos alimentados con BY y tratados por EVG afectaría negativamente la eficiencia de la TIE si los machos liberados no fueran capaces de encontrar fuentes de alimento que les permitieran recuperar sus reservas energéticas. Cabe destacar que la proteína utilizada en la preparación de la dieta HY es, actualmente, diez veces más cara que la proteína utilizada en la preparación de BY. Por lo tanto, la decisión de implementar un tratamiento por EVG, requeriría una cuidadosa evaluación de sus costos y beneficios.

En el capítulo IV, R-limoneno y (E/Z)- β -ocimeno fueron identificados como los compuestos candidatos responsables de la estimulación sexual de los machos tras la EVG. El efecto estimulador de estos compuestos resultó dosis-dependiente y se incrementó cuando los machos fueron expuestos a una combinación de ambos. Nuevos estudios que evalúen la exposición de machos alimentados con HY a esta mezcla de compuestos permitiría una mejor evaluación del uso de fitoquímicos como estimuladores sexuales en un contexto de TIE. Además, la identificación de estos compuestos mediante un análisis químico permitiría pre-seleccionar otras fuentes de volátiles más efectivas y/o más baratas capaces de estimular el comportamiento sexual de los machos. Por último, los resultados de este trabajo fueron

obtenidos utilizando como modelo de estudio machos de *A. fraterculus* no estériles criados en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, como se mencionó al inicio de esta tesis, requerirán validación para ser interpretados sobre machos irradiados y criados masivamente cuando la TIE se encuentre completamente desarrollada para esta especie.

Mecanismos subyacentes

De acuerdo con el análisis de expresión diferencial, los machos EVG sobre-expresan genes relacionados al catabolismo de polisacáridos y la síntesis de óxido nítrico. Por un lado, la sobre-expresión de genes relacionados a la biosíntesis de óxido nítrico (una molécula que funciona como neurotransmisor en el sistema nervioso) podría estar vinculada a cambios en la sensibilidad olfativa que median la habituación de las neuronas durante la EVG. Además, en otras especies de insectos, la señalización por óxido nítrico también participa en la regulación de cambios comportamentales que responden a la integración de factores internos (como el estado madurativo y nutricional) y externos (como estímulos ambientales). Así, la estimulación del comportamiento de cortejo producto de la EVG [la cual fue observada sólo en machos maduros y alimentados con dietas proteicas de baja calidad (BY)] podría estar mediada por la señalización de ON sobre interneuronas del sistema nervioso central (las cuales integran tanto claves metabólicas como olfativas). Por otro lado, varios genes sobre-expresados en machos EVG fueron identificados como quitinasas, es decir enzimas que participan en la degradación de quitina. Dado que la expresión de estas enzimas se encuentra regulada por hormonas esteroideas y que la señalización por óxido nítrico participa en la regulación de células neurosecretoras de hormonas, estudios que se centren en el rol de estas hormonas durante la estimulación por EVG podrían profundizar el conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a este fenómeno.

Concordantemente con el aumento en la expresión de genes relacionados al catabolismo de polisacáridos, los resultados del capítulo III indican que los machos EVG incrementan el consumo de reservas energéticas (carbohidratos y triglicéridos) luego del tratamiento de exposición, posiblemente debido a la alta demanda energética requerida durante el cortejo. La estimulación del comportamiento sexual por EVG solo pudo ser evidenciada en machos alimentados con proteína. Así, este recurso otorgaría a los machos metabolitos esenciales que son utilizados durante el cortejo o la reproducción. Además, el efecto de la EVG es evidenciado en machos alimentados con BY, pero no en machos alimentados con HY. La guayaba se ha identificado como el único hospedante común compartido por diversas poblaciones de *A. fraterculus*, y se ha propuesto como uno de los más influyentes en la diversificación original de este complejo de especies. Por lo tanto, los machos de *A. fraterculus* podrían estar adaptados a reconocer los volátiles de guayaba como una clave ambiental que indica condiciones propicias para la reproducción. En este sentido, cuando los machos presentan cierta restricción nutricional (como puede ser el caso de los machos alimentados con BY), percibir volátiles de guayaba podría desencadenar una reasignación energética hacia actividades reproductivas. Así, el efecto estimulador de la EVG podría representar una estrategia evolutiva mediante la cual los machos reasignan sus recursos energéticos hacia actividades reproductivas cuando el ambiente es propicio para la reproducción, aumentando así, las chances de éxito reproductivo. Sin embargo, estudios que analicen comportamientos reproductivos y no reproductivos, así como su correlación con el metabolismo energético de los machos son necesarios para poner a prueba esta hipótesis.

En resumen

- La exposición de machos de *A. fraterculus* a compuestos volátiles de un aceite esencial de guayaba (AG) estimula su comportamiento de llamado, pero no acelera su maduración sexual.
- La exposición a volátiles de guayaba (EVG) no afecta la capacidad de los machos para resistir el hambreado.
- El efecto estimulador de la EVG depende de la edad a la que los machos son expuestos. Sólo los machos expuestos a edades maduras pueden ser estimulados sexualmente mediante un tratamiento por EVG.
- El efecto estimulador de la EVG depende la dieta suministrada a los machos. La estimulación del comportamiento sexual pudo ser evidenciada sobre machos alimentados con una mezcla de azúcar y levadura de cerveza en una proporción 3:1 (BY), pero no sobre machos alimentados con azúcar o con una mezcla de azúcar e hidrolizado de levadura en una proporción (12:1).
- Los machos estimulados mediante la EVG presentan un incremento en la expresión de genes relacionados al catabolismo de polisacáridos y la síntesis de óxido nítrico.
- Los machos estimulados mediante la EVG incrementan el consumo de glucógeno y triglicéridos.
- R-limoneno y (E/Z)- β -ocimeno son parte de los compuestos responsables del efecto estimulador de la EVG. La exposición a cualquiera de estos compuestos provoca la estimulación sexual de los machos de manera dosis-dependiente. El efecto estimulador puede incrementarse mediante la exposición a una mezcla de ambos compuestos.

Tabla II.9. Se muestran los resultados de la anotación de GDE con proteína predicha mediante Blast2Go.

Proteína predicha	Nombre	Especie	E-value	% Similitud	Referencia	GO IDs	GO Names
TRINITY_DN7834_c0_g1_i2.p2							
TRINITY_DN21367_c0_g1_i1.p1	peritrophin-1-like	<i>Anastrepha ludens</i>	7.36363E-48	96.2	XP_053953808	F:GO:0008061; C:GO:0005576	F:chitin binding; C:extracellular region
TRINITY_DN8_c40_g1_i3.p1	LINE-1 retrotransposable element	<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	3.48165E-32	85.9	XP_054087908	P:GO:0006278; F:GO:0003964	P:RNA- templated DNA biosynthetic process; F:RNA- directed DNA polymerase activity
TRINITY_DN3499_c2_g4_i1.p1	MOS1T transposase	<i>Pseudoatta argentina</i>	1.66592E-28	84.1	KAG5327670		
TRINITY_DN79624_c0_g1_i1.p1	putative DD41D transposase	<i>Anastrepha ludens</i>	4.53866E-41	0.93	XP_053960413	F:GO:0003676	F:nucleic acid binding
TRINITY_DN25826_c4_g1_i1.p2	putative 115 kDa protein	<i>Bradysia coprophila</i>	1.09672E-05		XP_037045755	P:GO:0006278; P:GO:0071897; P:GO:0090502; F:GO:0003676; F:GO:0003824; F:GO:0003887; F:GO:0003964; F:GO:0004523; F:GO:0046872; C:GO:0016020; C:GO:0016020; C:GO:0042575	P:RNA- templated DNA biosynthetic process; P:DNA biosynthetic process; P:RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic; F:nucleic acid binding; F:catalytic activity; F:DNA- directed DNA polymerase activity; F:RNA- directed DNA

							polymerase activity; F:RNA-DNA hybrid ribonuclease activity; F:metal ion binding; C:membrane; C:membrane; C:DNA polymerase complex
TRINITY_DN7879_c3_g1_i1.p1	probable RNA-directed DNA polymerase	<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	2.86121E-17	67.9	XP_054088079	P:GO:0071897; F:GO:0003824	P:DNA biosynthetic process; F:catalytic activity
TRINITY_DN1883_c0_g1_i1.p1	uncharacterized protein	<i>Anastrepha ludens</i>	1.55627E-46	94.4	XP_053953231	F:GO:0008061; C:GO:0005576	F:chitin binding; C:extracellular region
TRINITY_DN9051_c0_g1_i2.p1	protein unc-80 homolog	<i>Anastrepha ludens</i>	7.1161E-170	99.6	XP_053962947		
TRINITY_DN4389_c0_g1_i2.p1	chitin deacetylase 7	<i>Anastrepha ludens</i>	0	97.2	XP_053962193	P:GO:0005975; F:GO:0016810	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds
TRINITY_DN1301_c1_g1_i19.p1	mucine 2-like	<i>Anastrepha ludens</i>	4.08207E-65	99	XP_053965248	F:GO:0008061; C:GO:0005576	F:chitin binding; C:extracellular region
TRINITY_DN48645_c0_g1_i2.p1	mucine 2-like	<i>Anastrepha ludens</i>	1.14924E-41	94.8	XP_053964190	F:GO:0008061; C:GO:0005576	F:chitin binding; C:extracellular region

TRINITY_DN5449_c0_g1_i1.p1	enhancer of split M1 protein	<i>Anastrepha ludens</i>	6.2177E-124	100	XP_053949145	F:GO:0003676	F:nucleic acid binding
TRINITY_DN576_c0_g1_i53.p1	cell surface glycoprotein 1-like	<i>Anastrepha ludens</i>	2.04987E-82	95	XP_053956322	F:GO:0008061; C:GO:0005576	F:chitin binding; C:extracellular region
TRINITY_DN7706_c0_g1_i12.p1	apolipoprotein D-like	<i>Anastrepha ludens</i>	1.1573E-128	94.9	P_053962578	F:GO:0031409	F:pigment binding
TRINITY_DN64021_c1_g1_i2.p1	RNA-directed DNA polymerase	<i>Lasius niger</i>	2.64242E-16	80	KMQ85605	P:GO:0006278; F:GO:0003964	P:RNA-templated DNA biosynthetic process; F:RNA-directed DNA polymerase activity
TRINITY_DN16324_c0_g2_i1.p2	RNA-directed DNA polymerase	<i>Anastrepha ludens</i>	6.25892E-14	91.7	XP_053960810	P:GO:0071897; F:GO:0005488; F:GO:0016787; F:GO:0034061	P:DNA biosynthetic process; F:binding; F:hydrolase activity; F:DNA polymerase activity
TRINITY_DN51319_c0_g3_i2.p1	SETMR methyltransferase	<i>Cryptotermes secundus</i>	6.33997E-09	79.1	XP_023703819	P:GO:0006259; P:GO:0050790; F:GO:0016740	P:DNA metabolic process; P:regulation of catalytic activity; F:transferase activity
TRINITY_DN4423_c0_g1_i2.p1	trypsin I-P1-like	<i>Anastrepha ludens</i>	0	97.6	XP_053947898	P:GO:0006508; F:GO:0004252	P:proteolysis; F:serine-type endopeptidase activity
TRINITY_DN36478_c0_g3_i2.p1	N-methyltransferase SETMAR-like	<i>Camponotus floridanus</i>	8.06441E-22	76.5	XP_011267570	P:GO:0008152; F:GO:0016740	P:metabolic process;

							F:transferase activity
TRINITY_DN23916_c4_g1_i1.p1	uncharacterized protein	<i>Anastrepha ludens</i>	8.66386E-06	75.8	XP_053969687		
TRINITY_DN27953_c0_g1_i1.p1	glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	<i>Anastrepha ludens</i>	1.82575E-49	94.6	XP_053968713		
TRINITY_DN5880_c2_g2_i1.p1	putative DD41D transposase	<i>Acanthoscelides obtectus</i>	2.80226E-28	80	CAH1988625	F:GO:0003676	F:nucleic acid binding
TRINITY_DN16062_c0_g3_i1.p1	unnamed protein product	<i>Hermetia illucens</i>	2.25031E-14	56.8	CAD7085101	P:GO:0071897; P:GO:0090502; F:GO:0003676; F:GO:0003824; F:GO:0003887; F:GO:0004523; F:GO:0046872; C:GO:0016020; C:GO:0016020; C:GO:0042575	P:DNA biosynthetic process; P:RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic; F:nucleic acid binding; F:catalytic activity; F:DNA-directed DNA polymerase activity; F:RNA-DNA hybrid ribonuclease activity; F:metal ion binding; C:membrane; C:membrane; C:DNA polymerase complex
TRINITY_DN558_c0_g1_i10.p1	mucine-2	<i>Anastrepha ludens</i>	4.2704E-167	88.1	XP_053954467	F:GO:0008061; C:GO:0005576	F:chitin binding; C:extracellular region
TRINITY_DN117179_c0_g1_i1.p1	Hypothetical predicted protein	<i>Anastrepha ludens</i>	0	99	XP_053966036		
TRINITY_DN33216_c1_g1_i4.p1	Hypothetical predicted protein	<i>Anastrepha ludens</i>	1.55369E-66	99.1	XP_053954542	F:GO:0008061	F:chitin binding

TRINITY_DN6624_c0_g1_i12.p1	chitinase-3-like protein 1	<i>Anastrepha ludens</i>	0	98.6	XP_053957941	P:GO:0005975; P:GO:0006032; F:GO:0004568; F:GO:0008061; C:GO:0005576	P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process; F:chitinase activity; F:chitin binding; C:extracellular region
TRINITY_DN28242_c1_g1_i1.p2	Transposable element Tcb1 transposase	<i>Araneus ventricosus</i>	2.57874E-11	83.7	GBO26137	F:GO:0003676	F:nucleic acid binding
TRINITY_DN35310_c0_g1_i3.p1	putative reverse transcriptase	<i>Bactrocera oleae</i>	3.44085E-15	64.5	XP_036218809	P:GO:0006278; P:GO:0071897; P:GO:0090502; F:GO:0003676; F:GO:0003887; F:GO:0003964; F:GO:0004523; F:GO:0046872; C:GO:0042575	P:RNA- templated DNA biosynthetic process; P:DNA biosynthetic process; P:RNA phosphodiester bond hydrolysis, endonucleolytic; F:nucleic acid binding; F:DNA- directed DNA polymerase activity; F:RNA- directed DNA polymerase activity; F:RNA- DNA hybrid ribonuclease activity; F:metal ion binding; C:DNA polymerase complex

TRINITY_DN108160_c0_g1_i1.p2	uncharacterized protein	<i>Bactrocera dorsalis</i>	6.42421E-05	63.1	XP_049314688		
TRINITY_DN30582_c2_g1_i1.p2	probable RNA-directed DNA polymerase	<i>Rhagoletis pomonella</i>	2.40321E-09	60.9	XP_036342120	P:GO:0071897; F:GO:0003824	P:DNA biosynthetic process; F:catalytic activity
TRINITY_DN44253_c0_g1_i2.p2	fibroin heavy chain	<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	2.8961E-35	86.7	XP_054084901		
TRINITY_DN8030_c5_g1_i1.p1	N-methyltransferase SETMAR-like	<i>Danaus chrysippus</i>	7.63942E-15	78.4	CAG9566679	F:GO:0003676	F:nucleic acid binding
TRINITY_DN46995_c0_g1_i2.p1	microfibril-associated glycoprotein 4-like	<i>Anastrepha ludens</i>	3.38759E-24	88.1	XP_053969328		
TRINITY_DN3360_c11_g1_i1.p1	probable RNA-directed DNA polymerase	<i>Anastrepha ludens</i>	2.80672E-49	96.5	XP_053960945	P:GO:0071897; F:GO:0003824	P:DNA biosynthetic process; F:catalytic activity
TRINITY_DN6698_c0_g2_i1.p1	putative transposable element	<i>Trichonephila clavipes</i>	4.25608E-05	63	GFY29139		

Referencias

- Abraham, S., Cladera, J., Goane, L., y Teresa Vera, M. (2012). Factors affecting *Anastrepha fraterculus* female receptivity modulation by accessory gland products. *Journal of Insect Physiology* 58, 1-6. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.08.007.
- Abraham, S., Goane, L., Cladera, J., y Vera, M. T. (2011). Effects of male nutrition on sperm storage and remating behavior in wild and laboratory *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females. *Journal of Insect Physiology* 57, 1501-1509. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.08.004.
- Abraham, S., Lara-Pérez, L. A., Rodríguez, C., Contreras-Navarro, Y., Nuñez-Beverido, N., Ovruski, S., et al. (2016). The male ejaculate as inhibitor of female remating in two tephritid flies. *Journal of Insect Physiology* 88, 40-47. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.03.001.
- Aceituno-Medina, M., y Hernández, E. (2020). «Dietas artificiales: evolución, retos y tendencias», en *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*, 421-448. ISBN: 978-607-7552-06-2
- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 8, 804.
- Adams, T. S., Dillwith, J. W., y Blomquist, G. J. (1984). The role of 20-hydroxyecdysone in housefly sex pheromone biosynthesis. *Journal of Insect Physiology* 30, 287-294. doi:10.1016/0022-1910(84)90129-X.
- Adnan, S. M., Farhana, I., Inskeep, J., Rempoulakis, P., y Taylor, P. W. (2020). Dietary methoprene enhances sexual competitiveness of sterile male Queensland fruit flies in field cages. *Journal of Pest Science* 93, 477-489. doi:10.1007/s10340-019-01170-0.
- Akamine, E. K., y Goo, T. (1979). Respiration and ethylene production in fruits of species and cultivars of *Psidium* and Species of *Eugenia*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104, 632-635. doi:10.21273/jashs.104.5.632.
- Akter, H., Adnan, S., Morelli, R., Rempoulakis, P., y Taylor, P. W. (2017). Suppression of cue lure attraction in male Queensland fruit flies provided raspberry ketone supplements as immature adults. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0184086.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., et al. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology* 37, 420-423. doi:10.1038/s41587-019-0036-z.
- Aluja, M., Jacome, I., Birke, A., Lozada, N., y Quintero, G. (1993). Basic patterns of behavior in wild *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) flies under field-cage conditions. *Annals of the Entomological Society of America* 86, 776-793. doi:10.1093/aesa/86.6.776.

- Aluja, M., Jácome, I., y Macías-Ordóñez, R. (2001). Effect of adult nutrition on male sexual performance in four neotropical fruit fly species of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior* 14, 759-775. doi:10.1023/A:1013037400676.
- Aluja, M., y Mangan, R. L. (2008). Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Host status determination: Critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annual Review of Entomology* 53, 473-502. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093350.
- Aluja, M., y Norrbom, A. L. (1999). Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behavior. *Crc Press*. 85, 1-987. doi:10.1201/9781420074468.
- Andrés, V. S., Pérez-Panadés, J., Carbonell, E. A., Castañera, P., y Urbaneja, A. (2009). Effects of post-teneral nutrition and ginger root oil exposure on longevity and mortality in bait treatments of sterile male *Ceratitis capitata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 132, 256-263. doi:10.1111/j.1570-7458.2009.00893.x.
- Andrews, S. (2010). FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Araújo, V., Serrão, J., Antonini, Y., Dias, L., y Neto, J. (2020). Structural changes in the male reproductive tract of the stingless bee *Scaptotrigona xanthotricha* Moure 1950 (Meliponini, Apidae) during sexual maturation. *Sociobiology* 67, 526-534.
- Arita, L. H., y Kaneshiro, K. Y. (1989). Sexual selection and lek behavior in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pacific Science* 43, 135-143.
- Arredondo, J., Ruiz, L., López, G., Pérez-Staples, D., y Díaz-Fleischer, F. (2020). Female presence enhances sexual performance of sterile *Anastrepha ludens* males of the Tapachula-7 GSS strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 168, 626-634. doi:10.1111/eea.12947.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., y Arif, M. S. (2018). «Environmental stress and secondary metabolites in plants», en *Plant metabolites and regulation under environmental Stress*. Elsevier Inc. 153-167. doi:10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X.
- Bachmann, G. E. (2016). Factores que afectan el éxito de apareamiento de machos de la Mosca sudamericana de la fruta, *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Available at: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5936_Bachmann.pdf.
- Bachmann, G. E., Devescovi, F., Nussenbaum, A. L., Cladera, J. L., Fernández, P. C., Vera, M. T., et al. (2017). Male sexual enhancement after methoprene treatment in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): A sustained response that does not fade away after sexual maturation. *Journal of Insect Physiology* 101, 7-14. doi:10.1016/j.jinsphys.2017.06.009.
- Bachmann, G. E., Devescovi, F., Nussenbaum, A. L., Milla, F. H., Shelly, T. E., Cladera, J. L., et al. (2019). Mate choice confers direct benefits to females of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE* 14, 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0214698.
- Bachmann, G., Segura, D., Devescovi, F., Juarez, M., Ruiz, J., Vera, T., et al. (2015). Male sexual behavior and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. *PLoS ONE* 10, 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0124250.

- Baker, B. S., Taylor, B. J., y Hall, J. C. (2001). Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*. *Cell* 105, 13-24. doi:10.1016/S0092-8674(01)00293-8.
- Barry, J. D., McInnis, D. O., Gates, D., y Morse, J. G. (2003). Effects of irradiation on mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae): Emergence, survivorship, lure attraction, and mating competition *Journal of Economic Entomology*. 96, 615-622. doi:10.1093/jee/96.3.615.
- Bateman, M. A. (1972). The Ecology of fruit flies. *Annual Reviews* 493-518. Available at: www.annualreviews.org.
- Bateman, M. A. (1977). Dispersal and species interaction as factors in the establishment and success of tropical fruit flies in new areas. *Proceedings of the Ecological Society of Australia* 10, 106-112.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., y Walker, S. (2015). Fitting linear mixed-effects models using {lme4}. *Journal of Statistical Software* 67, 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Bennett, R. N., y Wallsgrave, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127, 617-633. doi:10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x.
- Beran, F., Köllner, T. G., Gershenzon, J., y Tholl, D. (2019). Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. *New Phytologist* 223, 52-67. doi:10.1111/nph.15718.
- Beran, F., y Petschenka, G. (2022). Sequestration of plant defense compounds by insects: From mechanisms to insect-plant coevolution. *Annual Review of Entomology* 67, 163-180. doi:10.1146/annurev-ento-062821-062319.
- Beyaert, I., Wäschke, N., Scholz, A., Varama, M., Reinecke, A., y Hilker, M. (2010). Relevance of resource-indicating key volatiles and habitat odour for insect orientation. *Animal Behaviour* 79, 1077-1086. doi:10.1016/j.anbehav.2010.02.001.
- Bicker, G. (2001). Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. *Cell and Tissue Research* 303, 137-146. doi:10.1007/s004410000321.
- Billeter, J. C., y Goodwin, S. F. (2004). Characterization of *Drosophila* fruitless-gal4 transgenes reveals expression in male-specific fruitless neurons and innervation of male reproductive structures. *Journal of Comparative Neurology* 475, 270-287. doi:10.1002/cne.20177.
- Biondi, A., Mommaerts, V., Smagghe, G., Viñuela, E., Zappalà, L., y Desneux, N. (2012). The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest Management Science* 68, 1523-1536. doi:10.1002/ps.3396.
- Birkett, M. A., Campbell, C. A. M., Chamberlain, K., Guerrieri, E., Hick, A. J., Martin, J. L., et al. (2000). New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9329-9334. doi:10.1073/pnas.160241697.
- Blay, S., y Yuval, B. (1997). Nutritional correlates of reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Animal Behaviour* 54, 59-66. doi:10.1006/anbe.1996.0445.

- Boake, C., Shelly, T., y Kaneshiro, K. (1996). Sexual selection in relation to pest-management strategies. *Annual Reviews* 41, 29.
- Boggs, C. L. (2009). Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Functional Ecology* 23, 27-37. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01527.x.
- Bolger, A., Lohse, M., y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Borrego, L. G., Ramarosandratana, N., Jeanneau, E., Métaf, E., Ramanandraibe, V. V., Andrianjafy, M. T., et al. (2021). Effect of the stereoselectivity of para-menthane-3,8-diol isomers on repulsion toward *Aedes albopictus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.1c03897.
- Borrero-Echeverry, F., Bengtsson, M., Nakamuta, K., y Witzgall, P. (2018). Plant odor and sex pheromone are integral elements of specific mate recognition in an insect herbivore. *Evolution* 72, 2225-2233. doi:10.1111/evo.13571.
- Borrero-Echeverry, F., Solum, M., Trona, F., Wallin, E. A., Witzgall, P., y Lebreton, S. (2021). Z4-11Al mediates olfactory attraction and courtship in *Drosophila melanogaster*. *bioRxiv*, 2021.01.06.425638. Available at: <https://doi.org/10.1101/2021.01.06.425638>.
- Bouyer, J., & Vreysen, M. J. (2020). Yes, irradiated sterile male mosquitoes can be sexually competitive!. *Trends in parasitology* 36:11, 877-880.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72, 248-254.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., y Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* 34, 525-527. doi:10.1038/nbt.3519.
- Briceño, D., Eberhard, W., y Shelly, T. (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, A. L., Vanícková, L., Mendonça, A. L., Eduardo Da Silva, C., Tomčala, A., et al. (2013). Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Florida Entomologist* 96, 1107-1115. doi:10.1653/024.096.0351.
- Broz, A. K., Broeckling, C. D., De-la-Peña, C., Lewis, M. R., Greene, E., Callaway, R. M., et al. (2010). Plant neighbor identity influences plant biochemistry and physiology related to defense. *BMC Plant Biology* 10, 115. doi:10.1186/1471-2229-10-115.
- Bruce, T. J. A. (2015). Interplay between insects and plants: Dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. *Journal of Experimental Botany* 66, 455-465. doi:10.1093/jxb/eru391.
- Bruce, T. J. A., y Pickett, J. A. (2011). Perception of plant volatile blends by herbivorous insects - finding the right mix. *Phytochemistry* 72, 1605-1611. doi:10.1016/j.phytochem.2011.04.011.

- Bruce, T. J. A., Wadhams, L. J., y Woodcock, C. M. (2005). Insect host location: A volatile situation. *Trends in Plant Science* 10, 269-274. doi:10.1016/j.tplants.2005.04.003.
- Bryant, D. M., Johnson, K., DiTommaso, T., Tickle, T., Couger, M. B., Payzin-Dogru, D., et al. (2017). A tissue-mapped axolotl *de novo* transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports* 18, 762-776. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.063.
- Byers, J. A. (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. doi:10.1007/BF00987784.
- Byers, J. A. (2013). Modeling and regression analysis of semiochemical dose-response curves of insect antennal reception and behavior. *Journal of Chemical Ecology* 39, 1081-1089. doi:10.1007/s10886-013-0328-6.
- Byers, J. A., Wood, D. L., Browne, L. E., Fish, R. H., Piatek, B., y Hendry, L. B. (1979). Relationship between a host plant compound, myrcene and pheromone production in the bark beetle, *Ips paraconfusus*. *Journal of Insect Physiology* 25, 477-482. doi:10.1016/S0022-1910(79)80005-0.
- Cáceres, C., Segura, D. F., Vera, M. T., Wornoayporn, V., Cladera, J. L., 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. doi:10.1111/j.1095-8312.2008.01193.x.
- Cappa, F., Baracchi, D., y Cervo, R. (2022). Biopesticides and insect pollinators: Detrimental effects, outdated guidelines, and future directions. *Science of the Total Environment* 15, 14. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155714
- Chacón-Benavente, R., López-Guillen, G., Hernández, E., Rojas, J. C., y Malo, E. A. (2013). Juvenile hormone analog enhances calling behavior, mating success, and quantity of volatiles released by *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 42, 262-269. doi:10.1603/en12045.
- Chen, J., Tang, B., Chen, H., Yao, Q., Huang, X., Chen, J., et al. (2010). Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by rna interference. *PLoS ONE* 5. doi:10.1371/journal.pone.0010133.
- Chen, M. S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Science* 15, 101-114. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00190.x.
- Chen, S., Zhang, L., Cai, X., Li, X., Bian, L., Luo, Z., et al. (2020a). (E)-Nerolidol is a volatile signal that induces defenses against insects and pathogens in tea plants. *Horticulture Research* 7. doi:10.1038/s41438-020-0275-7.
- Chen, Y., Gu, F., Zhong, G., y Yi, X. (2020b). Role of fruitless in courtship and mating behaviors in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica* 63, 924-931.
- Cheriyamkunnel, S. J., Rose, S., Jacob, P. F., Blackburn, L. A., Glasgow, S., Moorse, J., et al. (2021). A neuronal mechanism controlling the choice between feeding and sexual behaviors in *Drosophila*. *Current Biology* 31, 4231-4245.e4. doi:10.1016/j.cub.2021.07.029.

- Cladera, J. L., Vilardi, J. C., Juri, M., Paulin, L. E., Giardini, M. C., Gómez Cendra, P. V., 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. doi:10.1186/1471-2156-15-S2-S12.
- Clowney, E. J., Iguchi, S., Bussell, J. J., Scheer, E., y Ruta, V. (2015). Multimodal chemosensory circuits controlling male courtship in *Drosophila*. *Neuron* 87, 1036-1049. doi:10.1016/j.neuron.2015.07.025.
- Cohen, A. C. (2015). *Insect diets: science and technology*. Segunda ed. Boca Raton, Florida, USA: CRC press.
- Conchou, L., Lucas, P., Meslin, C., Proffit, M., Staudt, M., y Renou, M. (2019). Insect odorscapes: From plant volatiles to natural olfactory scenes. *Frontiers in Physiology* 10. doi:10.3389/fphys.2019.00972.
- Conesa, A., y Götz, S. (2008). Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Bioinformatics Tools for Plant Genomics* 619832. Available at: <https://doi.org/10.1155/2008/619832>.
- Cortés-Martínez, F., Cruz-López, L., Liedo, P., y Rojas, J. C. (2021). The ripeness stage but not the cultivar influences the attraction of *Anastrepha obliqua* to guava. *Chemoecology* 31, 115-123. doi:10.1007/s00049-020-00332-2.
- Costa, K. Z., Costa, M. L. Z., Botteon, V. W., Faggioni, K. M., Costa, N., y Mastrangelo, T. (2020). Quality control and characterization of the testicles and ovaries of irradiated *Anastrepha obliqua* from Brazil. *Scientia Agricola* 77, 1-7. doi:10.1590/1678-992x-2017-0253.
- Cunningham, J. P., Carlsson, M. A., Villa, T. F., Dekker, T., y Clarke, A. R. (2016). Do fruit ripening volatiles enable resource specialism in polyphagous fruit flies? *Journal of Chemical Ecology* 42, 931-940. doi:10.1007/s10886-016-0752-5.
- Dauwalder, B., Tsujimoto, S., Moss, J., y Mattox, W. (2002). The *Drosophila* takeout gene is regulated by the somatic sex-determination pathway and affects male courtship behavior. *Genes and Development* 16, 2879-2892. doi:10.1101/gad.1010302.
- de Souza, T. da S., Ferreira, M. F. da S., Menini, L., Souza, J. R. C. de L., Bernardes, C. de O., y Ferreira, A. (2018). Chemotype diversity of *Psidium guajava* L. *Phytochemistry* 153, 129-137. doi:10.1016/j.phytochem.2018.06.006.
- Demain, A. L., y Fang, A. (2000). «The natural functions of secondary metabolites.», en *History of Modern Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, ed. A. Fiechter (Springer Berlin Heidelberg), 1-39. doi:10.1007/3-540-44964-7_1.
- Deutscher, A. T., Chapman, T. A., Shuttleworth, L. A., Riegler, M., y Reynolds, O. L. (2019). Tephritid-microbial interactions to enhance fruit fly performance in sterile insect technique programs. *BMC Microbiology* 19, 1-14. doi:10.1186/s12866-019-1650-0.
- Diallo, S., Seck, M. T., Rayaissé, J. B., Fall, A. G., Bassene, M. D., Sall, B. et al. (2019). Chilling, irradiation and transport of male *Glossina palpalis gambiensis* pupae: Effect on the emergence, flight ability and survival. *PLoS one* 14:5, e0216802.

- Dias, N. P., Zotti, M. J., Montoya, P., Carvalho, I. R., y Nava, D. E. (2018). Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. *Crop Protection* 112, 187-200. doi:10.1016/j.cropro.2018.05.019.
- Díaz-Fleischer, F., y Aluja, M. (1999). Behavior of tephritid flies: A historical perspective. *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*, 39-70. doi:10.1201/9781420074468.
- Divekar, P. A., Narayana, S., Divekar, B. A., Kumar, R., Gadratagi, B. G., Ray, A., et al. (2022). Plant secondary metabolites as defense tools against herbivores for sustainable crop protection. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 2690. doi:10.3390/ijms23052690.
- Dolezal, T., Krejcova, G., Bajgar, A., Nedbalova, P., y Strasser, P. (2019). Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 109, 31-42. doi:10.1016/j.ibmb.2019.04.005.
- Drew, R. A. I. (2004). Biogeography and speciation in the Dacini (Diptera: Tephritidae: Dacinae). *Bishop Museum Bulletin in Entomology* 12, 165-178. Available at: <http://hdl.handle.net/10072/5230>.
- Duffey, S. S. (1980). Sequestration of plant natural products by insects. *Annual Review of Entomology* 25, 447-477. doi:10.1146/annurev.en.25.010180.002311.
- Dyck, V., Hendrichs, J., y Robinson, A. (2014). *Sterile Insect Technique*. Second edi. CRC Press.
- Ellendersen, B. E., y von Philipsborn, A. C. (2017). Neuronal modulation of *D. melanogaster* sexual behaviour. *Current Opinion in Insect Science* 24, 21-28. doi:10.1016/j.cois.2017.08.005.
- Enkerlin, W. R. (2021). «Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique», en *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management* (CRC press), 979-1006. doi:10.1007/1-4020-4051-2_25.
- Epsky, N., y Heath, R. (1993). Food availability and pheromone production by males of *Anastrepha suspensa* (Diptera:Tephritidae). *Environmental Entomology* 22, 942-947. doi:<https://doi.org/10.1093/ee/22.5.942>.
- Erb, M., y Robert, C. A. M. (2016). Sequestration of plant secondary metabolites by insect herbivores: Molecular mechanisms and ecological consequences. *Current Opinion in Insect Science* 14, 8-11. doi:10.1016/j.cois.2015.11.005.
- Ernawan, B., Tambunan, U. S. F., Sugoro, I., & Sasmita, H. I. (2017). Effects of gamma irradiation dose-rate on sterile male *Aedesaegypti*. In *AIP Conference Proceeding* 1854, 1. AIP Publishing.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., y Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32, 3047. doi:10.1093/bioinformatics/btw354.
- Fanson, B. G., Weldon, C. W., Pérez-Staples, D., Simpson, S. J., y Taylor, P. W. (2009). Nutrients, not caloric restriction, extend lifespan in Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*). *Aging Cell* 8, 514-523. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00497.x.
- FAO/IAEA/USDA (2019). Product quality control for sterile mass-reared and released Tephritid fruit

- flies. *International Atomic Energy Agency* 7, 148.
- Faria, M. J., Pereira, R., Dellinger, T., y Teal, P. E. A. (2008). Influence of methoprene and protein on survival, maturation and sexual performance of male *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 132, 812-819. doi:10.1111/j.1439-0418.2008.01360.x.
- Field, S. A., Kaspi, R., y Yuval, B. (2002). Why do calling medflies (Diptera: Tephritidae) cluster? Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution. *Florida Entomologist* 85, 63-72. doi:10.1653/0015-4040.
- Figueiredo, A. C. (2017). Biological properties of essential oils and volatiles : Sources of variability. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 4(4), 1-13.
- Flath, R. A., Cunningham, R. T., Mon, T. R., y John, J. O. (1994). Male lures for mediterranean fruitfly (*Ceratitis capitata* Wied.): Structural analogs of α -copaene. *Journal of Chemical Ecology* 20, 2595-2609. doi:10.1007/BF02036194.
- Flores, S., Rivera, J. P., Hernandez, E., y Montoya, P. (2011). The effect of ginger oil on the sexual performance of *Anastrepha* males (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 94, 916-922. doi:10.1653/024.094.0428.
- Foote, R. H., y Christenson, L. D. (1960). Biology of Fruit Fly. *Annual Review of Entomology* 5, 171-192.
- Fox, J., y Weisberg, S. (2018). *An {R} companion to applied regression*. Thousand Oaks CA: Sage.
- Fricke, C., Bretman, A., y Chapman, T. (2008). Adult male nutrition and reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 62, 3170-3177. doi:10.1111/j.1558-5646.2008.00515.x.
- Gadenne, C., Barrozo, R. B., y Anton, S. (2016). Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or Not to Smell? *Annual Review of Entomology* 61, 317-333. doi:10.1146/annurev-ento-010715-023523.
- Gailey, D. A., Billeter, J. C., Liu, J. H., Bauzon, F., Allendorfer, J. B., y Goodwin, S. F. (2006). Functional conservation of the fruitless male sex-determination gene across 250 Myr of insect evolution. *Molecular Biology and Evolution* 23, 633-643. doi:10.1093/molbev/msj070.
- Garcia, F. R. M., Ovruski, S. M., Suárez, L., Cancino, J., y Liburd, O. E. (2020). Biological control of tephritid fruit flies in the Americas and Hawaii: A review of the use of parasitoids and predators. *Insects* 11, 1-32. doi:10.3390/insects11100662.
- 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, 637-642. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.04.002.
- Gerofotis, C. D., Ioannou, C. S., y Papadopoulos, N. T. (2013). Aromatized to find mates: α -pinene aroma boosts the mating success of adult olive fruit flies. *PLoS ONE* 8, 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0081336.
- Giatropoulos, A., Papachristos, D. P., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Polissiou, M. G., Emmanouel, N., et al. (2012). Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric

- distribution. *Parasitology Research* 111, 2253-2263. doi:10.1007/s00436-012-3074-8.
- Goane, L., Pereyra, P. M., Castro, F., Ruiz, M. J., Juárez, M. L., Segura, D. F., et al. (2018). Yeast derivatives and wheat germ in the adult diet modulates fecundity in a tephritid pest. *Bulletin of Entomological Research* 109, 178-190. doi:10.1017/S0007485318000305.
- Gomez-Simuta, Y., Diaz-Fleisher, F., Arredondo, J., Díaz-Santiz, E., y Pérez-Staples, D. (2017). Precocious Mexican fruit fly methoprene-fed males inhibit female receptivity and perform sexually as mature males. *Journal of Applied Entomology* 141, 266-273. doi:10.1111/jen.12334.
- Gomez Cendra, P., Calcagno, G., Belluscio, L., y Vilardi, J. C. (2011). Male courtship behavior of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, from an Argentinean laboratory strain. *Journal of Insect Science* 11, 1-18. doi:10.1673/031.011.17501.
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., López-Gresa, M. P., Amparo Blázquez, M., y Granell, A. (2019). Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. *Frontiers in Plant Science* 10, 1-18. doi:10.3389/fpls.2019.00012.
- Grabherr, M., Haas, B., Yassour, M., Levin, J., Thompson, D., Amit, I., et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology* 29, 644-652. doi:https://doi.org/10.1038/nbt.1883.
- Grosjean, P., y Ibanez, F. (2018). Package for analysis of space-time ecological series. Available at: <https://cran.r-project.org/package=pastecs>.
- Gui, S., Yuval, B., Engl, T., Lu, Y., y Cheng, D. (2023). Protein feeding mediates sex pheromone biosynthesis in an insect. *eLife* 12. doi:10.7554/eLife.83469.
- Guillem-Amat, A., Sánchez, L., López-Errasquín, E., Ureña, E., Hernández-Crespo, P., y Ortego, F. (2020). Field detection and predicted evolution of spinosad resistance in *Ceratitis capitata*. *Pest Management Science* 76, 3702-3710. doi:10.1002/ps.5919.
- Guillen, D., y Sanchez, R. (2007). «Expansion of the national fruit fly control programme in Argentina.», en *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*, 653-660.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., et al. (2013). *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8, 1494-1512. doi:10.1038/nprot.2013.084.
- Haq, I. ul, Cáceres, C., Hendrichs, J., Teal, P., Wornoaayporn, V., Stauffer, C., et al. (2010). 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, 1503-1509. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.04.018.
- Harborne, J. B. (2001). Secondary metabolites: Attracting pollinators. *eLS*, 1-5. doi:10.1038/npg.els.0000909.
- Hassan, E. M., El Gendy, A. E. N. G., Abd-ElGawad, A. M., Elshamy, A. I., Farag, M. A., Alamery, S. F., et al. (2020). Comparative chemical profiles of the essential oils from different varieties of *Psidium guajava* L. *Molecules* 26, 1-11. doi:10.3390/molecules26010119.

- Heinrich, R., y Ganter, G. K. (2007). Nitric oxide / cyclic GMP signaling and insect behavior. 01, 107-127. doi:10.1016/S1872-2423(07)01005-8.
- Hendrichs, J. (2000). Use of the sterile insect technique against key insect pests. *Sustainable Development International*, 75-80.
- Hendry, L. B., Piatek, B., Browne, L. E., Wood, D. L., Byers, J. A., Fish, R. H., et al. (1980). In vivo conversion of a labelled host plant chemical to pheromones of the bark beetle *Ips paraconfusus*. *Nature* 284, 485. doi:10.1038/284485a0.
- Hernandez-Ortiz, A. M. (1993). Listado de especies del genero Neotropical Anastrepha (Diptera : Tephritidae) con notas sobre su distribucion y plantas hospederas. *Folia Entomologica Mexicana* 88:89-105
- Hernández-Ortiz, B.-J. and D.-C. (2020). «A Review of the natural host plants of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Americas», en *Area-Wide Management of Fruit Fly Pests* (Boca Raton: CRC Press), 90-114. doi:doi.org/10.1201/9780429355738.
- Hernández-Ortiz, V., Canal, N. A., Salas, J. O. T., Ruíz-Hurtado, F. M., y Dzul-Cauich, J. F. (2015). Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Mesoamerican and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). *ZooKeys* 540, 95.
- Hernández-Ortiz, V., Hernández-López, M., y Steck, G. (2020). «Morfología y taxonomía de Tephritidae: Especies de importancia económica y cuarentenaria en América», en *Moscas de la Fruta: Fundamentos y procedimientos para su manejo*, eds. P. Montoya, J. Toledo, y E. Hernández (Ciudad de México), 71-116.
- Hernández, E., Aceituno-medina, M., Flores, S., Rivera, P., y Montoya, P. (2020). «Aromaterapia y uso de la proteína para el mejoramiento del desempeño sexual», en *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*, eds. P. Montoya, J. Toledo, y E. Hernández (Ciudad de México), 533-548.
- Honda, K., Hori, M., Ômura, H., y Kainoh, Y. (2010). Allelochemicals in plant–insect interactions. *Comprehensive Natural Products II* 4, 563-594. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.02803-1.
- Hsu, J. C., y Feng, H. T. (2006). Development of resistance to spinosad in oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) in laboratory selection and cross-resistance. *Journal of Economic Entomology* 99, 931-936. doi:10.1093/jee/99.3.931.
- Huck, D. T., Klein, M. S., y Meuti, M. E. (2021). Determining the effects of nutrition on the reproductive physiology of male mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 129, 104191. doi:10.1016/j.jinsphys.2021.104191.
- Hughes, P. R. (1973). Effect of α -pinene exposure on trans-verbenol synthesis in *Dendroctonus ponderosae* Hopk. *Naturwissenschaften* 60, 261-262. doi:10.1007/BF00625726.
- Hughes, P. R. (1974). Myrcene: A precursor of pheromones in Ips beetles. *Journal of Insect Physiology* 20, 1271-1275. doi:10.1016/0022-1910(74)90232-7.
- Hurtado, J., Soto, E. ., Orellana, L., y Hasson, E. (2011). Mating success depends on rearing substrate

- in cactophilic *Drosophila*. *Evolutionary Ecology* 26, 733-743. doi:doi.org/10.1007/s10682-011-9529-z.
- Ito, H., Fujitani, K., Usui, K., Shimizu-Nishikawa, K., Tanaka, S., y Yamamoto, D. (1996). Sexual orientation in *Drosophila* is altered by the satori mutation in the sex-determination gene fruitless that encodes a zinc finger protein with a BTB domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 9687–9692.
- Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S., y Singh, R. (2003). Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and enzymatic changes. *Plant Foods for Human Nutrition* 58, 309-315. doi:10.1023/B:QUAL.0000040285.50062.4b.
- Jaleel, W., He, Y., y Lü, L. (2019). The response of two *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) to fruit volatiles. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22, 758-765. doi:10.1016/j.aspen.2019.05.011.
- Jensen, K., McClure, C., Priest, N. K., y Hunt, J. (2015). Sex-specific effects of protein and carbohydrate intake on reproduction but not lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 14, 605-615. doi:10.1111/ACEL.12333.
- Joachim-Bravo, I. S., Anjos, C. S., y Costa, A. M. (2009). The role of protein in the sexual behaviour of males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Mating success, copula duration and number of copulations. *Zoologia* 26, 407-412. doi:10.1590/S1984-46702009000300004.
- Jofré Barud, F. (2018). Aceites esenciales como agentes semioquímicos de diferentes comportamientos plausibles de control de la mosca de los frutos *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba.
- Juan-Blasco, M., San Andrés, V., Martínez-Utrillas, M. A., Argilés, R., Pla, I., Urbaneja, A., et al. (2013). Alternatives to ginger root oil aromatherapy for improved mating performance of sterile *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae) males. *Journal of Applied Entomology* 137, 244-251. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01688.x.
- Jurenka, R. (2004). Insect pheromone biosynthesis. *Topics in Current Chemistry* 239, 97-132. doi:10.1007/b95450.
- Kakani, E. G., Zygouridis, N. E., Tsoumani, K. T., Seraphides, N., Zalom, F. G., y Mathiopoulos, K. D. (2010). Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Management Science* 66, 447-453. doi:10.1002/ps.1921.
- Kaldun, B., y Otti, O. (2016). Condition-dependent ejaculate production affects male mating behavior in the common bedbug *Cimex lectularius*. *Ecology and Evolution* 6, 2548-2558. doi:10.1002/ece3.2073.
- Kamiji, T., Kaneda, M., Sasaki, M., y Ohto, K. (2018). Sexual maturation of male *Bactrocera correcta* (Diptera:Tephritidae) and age-related responses to β -caryophyllene and methyl eugenol. *Applied Entomology and Zoology* 53, 41-46. doi:10.1007/s13355-017-0525-9.
- Kampouraki, A., Stavrakaki, M., Karataraki, A., Katsikogiannis, G., Pitika, E., Varikou, K., et al. (2018). Recent evolution and operational impact of insecticide resistance in olive fruit fly *Bactrocera oleae* populations from Greece. *Journal of Pest Science* 91, 1429-1439. doi:10.1007/s10340-018-

1007-8.

- Kaspi, R., Taylor, P. W., y Yuval, B. (2000). Diet and size influence sexual advertisement and copulatory success of males in Mediterranean fruit fly leks. *Ecological Entomology* 25, 279-284. doi:10.1046/j.1365-2311.2000.00266.x.
- Kaspi, R., y Yuval, B. (1999). Lek site selection by male mediterranean fruit flies. *Journal of Insect Behavior* 12, 267-276. doi:10.1023/A:1020975018826.
- Kerkvliet, J., de Fouchier, A., van Wijk, M., y Groot, A. T. (2019). The Bellerophon pipeline, improving de novo transcriptomes and removing chimeras. *Ecology and Evolution* 9, 10513-10521. doi:10.1002/ece3.5571.
- Kessler, A., y Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 299-328. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135207.
- Khan, M. A. M., Shuttleworth, L. A., Osborne, T., Collins, D., Gurr, G. M., y Reynolds, O. L. (2019). Raspberry ketone accelerates sexual maturation and improves mating performance of sterile male Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Froggatt). *Pest Management Science* 75, 1942-1950. doi:10.1002/ps.5307.
- Kimura, K. ichi, Hachiya, T., Koganezawa, M., Tazawa, T., y Yamamoto, D. (2008). Fruitless and Doublesex coordinate to generate male-specific neurons that can initiate courtship. *Neuron* 59, 759-769. doi:10.1016/j.neuron.2008.06.007.
- Klowden, M. . (2007). «Metabolic systems», en *Physiological systems in insects*. Elsevier (San Diego, California), 293-388.
- Knipling, E. F. (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology* 48, 459-462.
- Kokkari, A. I., Milonas, P. G., Anastasaki, E., Floros, G. D., Kouloussis, N. A., y Koveos, D. S. (2021). Determination of volatile substances in olives and their effect on reproduction of the olive fruit fly. *Journal of Applied Entomology* 145, 841-855. doi:10.1111/jen.12929.
- Kouloussis, N. A., Gerofotis, C. D., Ioannou, C. S., Iliadis, I. V., Papadopoulos, N. T., y Koveos, D. S. (2017). Towards improving sterile insect technique: Exposure to orange oil compounds increases sexual signalling and longevity in *Ceratitis capitata* males of the Vienna 8 GSS. *PLoS ONE* 12, 1-18. doi:10.1371/journal.pone.0188092.
- Kramer, K. J., y Muthukrishnan, S. (1997). Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27, 887-900. doi:10.1016/S0965-1748(97)00078-7.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., y Sonnhammer, E. L. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305, 567-580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315.
- Kuenen, L. P. S., y Baker, T. C. (1981). Habituation versus sensory adaptation as the cause of reduced

- attraction following pulsed and constant sex pheromone pre-exposure in *Trichoplusia ni*. *Journal of Insect Physiology* 27, 721-726. doi:10.1016/0022-1910(81)90010-X.
- Kumaran, N., Prentis, P. J., Mangalam, K. P., Schutze, M. K., y Clarke, A. R. (2014). Sexual selection in true fruit flies (Diptera:Tephritidae): Transcriptome and experimental evidences for phytochemicals increasing male competitive ability. *Molecular Ecology* 23, 4645-4657. doi:10.1111/mec.12880.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P., y Christensen, R. (2017). lmerTest package: Tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software* 82, 1-26. doi:10.18637/jss.v082.i13.
- Landolt, P. J., y Phillips, T. W. (1997). Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 42, 371-391. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.371.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., y Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25.
- Lenth, R. (2020). emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.5.1.
- Levy, K., Shelly, T. E., y Yuval, B. (2005). Effects of the olfactory environment and nutrition on the ability of male mediterranean fruit flies to endure starvation. *Journal of Economic Entomology* 98, 61-65. doi:10.1093/jee/98.1.61.
- Li, Z., Ma, X., Fang, Y., Sun, Z., Qin, Y., y Wang, Q. (2013). Review on prevention and control techniques of Tephritidae invasion. *Plant Quarentine* 27, 1-10.
- Libert, S., y Pletcher, S. D. (2007). Modulation of longevity by environmental sensing. *Cell* 131, 1231-1234. doi:10.1016/j.cell.2007.12.002.
- Liedo, P., Orozco, D., Cruz-López, L., Quintero, J. L., Becerra-Pérez, C., del Refugio Hernández, M., et al. (2013). Effect of post-teneral diets on the performance of sterile *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* fruit flies. *Journal of Applied Entomology* 137, 49-60. doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01568.x.
- Liendo, M. C., Devescovi, F., Bachmann, G. E., Utgs, M. E., Abraham, S., Vera, M. T., 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, 1-13. doi:10.1017/S0007485312000442.
- Lima, I. S., House, P. E., y Do Nascimento, R. R. (2001). Volatile Substances from Male *Anastrepha fraterculus* Wied. (Diptera: Tephritidae): Identification and Behavioural Activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12, 196-201. doi:10.1590/S0103-50532001000200012.
- Limin, F., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., y Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28, 3150-3152. doi:10.1093/bioinformatics/bts565.
- Liu, X., Zhang, J., y Zhu, K. Y. (2019). Chitin in arthropods: Biosynthesis, modification, and metabolism.

- Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1142, 169-207. doi:10.1007/978-981-13-7318-3_9.
- Lopes, M. P., Fernandes, K. M., Tomé, H. V. V., Gonçalves, W. G., Miranda, F. R., Serrão, J. E., et al. (2018). Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and malpighian tubules of africanized honey bee workers. *Pest Management Science* 74, 1311-1318. doi:10.1002/ps.4815.
- Lux, S. A., Vilardi, J. C., Liedo, P., Gaggli, K., Calcagno, G. E., Munyiri, F. N., 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. doi:10.1653/0015-4040.
- Madden, T. (2002). «The BLAST sequence analysis tool», en *The NCBI Handbook*, eds. J. McEntyre y J. Ostell (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information).
- Malavasi, A., Morgante, J. S., y Prokopy, R. J. (1983). Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and nonhost trees. *Annals of the Entomological Society of America* 76, 286-292. doi:10.1093/aesa/76.2.286.
- Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., y Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO update: Novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Molecular Biology and Evolution* 38, 4647-4654. doi:10.1093/molbev/msab199.
- Manoli, D. S., Foss, M., Villella, A., Taylor, B. J., Hall, J. C., y Baker, B. S. (2005). Male-specific fruitless specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature* 436, 395-400. doi:10.1038/nature03859.
- Manoli, D. S., Meissner, G. W., y Baker, B. S. (2006). Blueprints for behavior: genetic specification of neural circuitry for innate behaviors. *Trends in Neurosciences* 29, 444-451. doi:10.1016/j.tins.2006.06.006.
- Marques, R. D., Lima, M. A. P., Marques, R. D., y Bernardes, R. C. (2020). A Spinosad-based formulation reduces the survival and alters the behavior of the stingless bee *Plebeia lucii*. *Neotropical Entomology* 49, 578-585. doi:10.1007/s13744-020-00766-x.
- Mastrangelo, T., da Silva, F. F., Mascarín, G. M., y da Silva, C. B. (2019). Multispectral imaging for quality control of laboratory-reared *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) pupae. *Journal of Applied Entomology* 143, 1072-1079. doi:10.1111/jen.12716.
- Mastrangelo, T., Kovaleski, A., Botteon, V., Scopel, W., y de Lourdes Zamboni Costa, M. (2018). Optimization of the sterilizing doses and overflooding ratios for the South American fruit fly. *PLoS ONE* 13, 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0201026.
- Mastrangelo, T., Kovaleski, A., Maset, B., Costa, M. de L. Z., Barros, C., Lopes, L. A., et al. (2021). Improvement of the mass-rearing protocols for the South American fruit fly for application of the sterile insect technique. *Insects* 12, 1-18. doi:10.3390/insects12070622.
- Mazomenos, B. E., y Haniotakis, G. E. (1981). A multicomponent female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmelin: Isolation and bioassay. *Journal of Chemical Ecology* 7, 437-444. doi:10.1007/BF00995766.

- McInnis, D. O., Shelly, T. E., y Komatsu, J. (2002). Improving male mating competitiveness and survival in the field for medfly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) SIT programs. *Genetica* 116, 117-124. doi:10.1023/A:1020919927542.
- Mendoza, M. (2010). Efecto de la exposición al aceite de la raíz de jengibre en el éxito para el apareamiento de machos de *Anastrepha fraterculus* Wiedemann (Diptera: Tephritidae).
- Merli, D., Mannucci, B., Bassetti, F., Corana, F., Falchetto, M., Malacrida, A. R., et al. (2018). Larval diet affects male pheromone blend in a laboratory strain of the Medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Chemical Ecology* 44, 339-353. doi:10.1007/s10886-018-0939-z.
- Meza, J. S., Bourtzis, K., Zacharopoulou, A., Gariou-Papalexiou, A., y Cáceres, C. (2020). Development and characterization of a pupal-colour based genetic sexing strain of *Anastrepha fraterculus* sp. 1 (Diptera: Tephritidae). *BMC Genetics* 21. doi:10.1186/s12863-020-00932-5.
- Milet-Pinheiro, P., Navarro, D. M. A., De Aquino, N. C., Ferreira, L. L., Tavares, R. F., da Silva, R. C. C., et al. (2015). Identification of male-borne attractants in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Chemoecology* 25, 115-122. doi:10.1007/s00049-014-0180-3.
- 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* 108, 621-628. doi:10.1093/jee/tou054.
- Moreau, J., Desouhant, E., Louâpre, P., Goubault, M., Rajon, E., Jarrige, A., et al. (2017). How host plant and fluctuating environments affect insect reproductive strategies? *Advances in Botanical Research* 81, 259-287. doi:10.1016/bs.abr.2016.09.008.
- Muller, U. (1997). The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiology* 51, 363-381. doi:10.1016/S0301-0082(96)00067-6.
- Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y., y Kramer, K. J. (2011). Chitin Metabolism in Insects In *Insect molecular biology and biochemistry*. Academic Press, 193-235. doi:10.1016/B978-0-12-384747-8.10007-8.
- Nation, J. L. (1972). Courtship Behavior and Evidence for a Sex Attractant in the Male Caribbean Fruit Fly, *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America* 65, 1364-1367. doi:10.1093/aesa/65.6.1364.
- Nestel, D., Papadopoulos, N. T., Pascacio-Villafán, C., Righini, N., Altuzar-Molina, A. R., y Aluja, M. (2016). Resource allocation and compensation during development in holometabolous insects. *Journal of Insect Physiology* 95, 78-88. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.09.010.
- Nishida, R. (2002). Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 47, 57-92.
- Nishida, R. (2014). Chemical ecology of insect-plant interactions: Ecological significance of plant secondary metabolites. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 78, 1-13. doi:10.1080/09168451.2014.877836.
- Nishida, R., y Fukami, H. (1989). Host plant iridoid-based chemical defense of an aphid, *Acyrtosiphon*

- nipponicus*, against ladybird beetles. *Journal of Chemical Ecology* 15, 1837-1845. doi:10.1007/BF01012270.
- Nishida, R., Shelly, T. E., Whittier, T. S., y Kaneshiro, K. Y. (2000). α -Copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*? *Journal of Chemical Ecology* 26, 87-100. doi:10.1023/A:1005489411397.
- Nishida, R., Shelly, T., y Kaneshiro, K. (1997). Acquisition of female-attracting fragrance from a Hawaiian lei flower, *Fagraea berteriana* by males of the oriental fruit fly. *Journal of Chemical Ecology* 23, 2275-2285.
- Nishida, R., Tan, K., Serit, M., Lajis, N., Sukari, A., Takahashi, S., et al. (1988). Accumulation of phenylpropanoids in the rectal glands of males of the Oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*. *Experientia* 44, 534-536.
- 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, 200-209.
- Orozco-Dávila, D., Quintero, L., Hernández, E., Solís, E., Artiaga, T., Hernández, R., et al. (2017). Mass rearing and sterile insect releases for the control of *Anastrepha* spp. pests in Mexico – a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 164, 176-187. doi:10.1111/eea.12581.
- Oviedo, A., Nestel, D., Papadopoulos, N. T., Ruiz, M. J., Prieto, S. C., Willink, E., et al. (2011). Management of protein intake in the fruit fly *Anastrepha fraterculus*. *Journal of Insect Physiology* 57, 1622-1630. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.08.013.
- Oviedo, A., Van Nieuwenhove, G., Van Nieuwenhove, C., y Rull, J. (2018). Biopesticide effects on pupae and adult mortality of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Austral Entomology* 57, 457-464. doi:10.1111/aen.12296.
- Oviedo, A., Van Nieuwenhove, G., Van Nieuwenhove, C., y Rull, J. (2020). Exposure to essential oils and ethanol vapors affect fecundity and survival of two frugivorous fruit fly (Diptera: Tephritidae) pest species. *Bulletin of Entomological Research*. doi:10.1017/S0007485320000085.
- Papachristos, D. P., Kimbaris, A. C., Papadopoulos, N. T., y Polissiou, M. G. (2009). Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Annals of Applied Biology* 155, 381-389. doi:10.1111/j.1744-7348.2009.00350.x.
- Papadopoulos, N. T., Kouloussis, N. A., y Katsoyannos, B. I. (2006a). Effect of plant chemicals on the behavior of the mediterranean fruit fly. *Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, 97-106.
- Papadopoulos, N. T., Shelly, T. E., Niyazi, N., y Jang, E. (2006b). 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. doi:10.1007/s10905-006-9031-6.
- Papanastasiou, S. A., Bali, E. M. D., Ioannou, C. S., Papachristos, D. P., Zarpas, K. D., y Papadopoulos, N. T. (2017). Toxic and hormetic-like effects of three components of citrus essential oils on adult Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*). *PLoS ONE* 12, 1-12.

doi:10.1371/journal.pone.0177837.

- Paranhos, B. J., Mcinnis, D., Morelli, R., Castro, R. M., Garziera, L., Paranhos, L. G., et al. (2013). Optimum dose of ginger root oil to treat sterile Mediterranean fruit fly males (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 137, 83-90. doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01595.x.
- Paranhos, B. J., Papadopoulos, N. T., McInnis, D., Gava, C., Lopes, F. S. C., Morelli, R., et al. (2010). Field dispersal and survival of sterile medfly males aromatically treated with ginger root oil. *Environmental Entomology* 39, 570-575. doi:10.1603/EN08309.
- Parthasarathy, R., Tan, A., Sun, Z., Chen, Z., Rankin, M., y Palli, S. R. (2009). Juvenile hormone regulation of male accessory gland activity in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Mechanisms of Development* 126, 563-579. doi:10.1016/j.mod.2009.03.005.
- Passos Roriz, A. K., F. Japyassú, H., y Sordi Joachim-Bravo, I. (2018). Courtship in two morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex and their implications for understanding mate recognition. *Journal of Insect Behavior* 31, 535-551. doi:10.1007/s10905-018-9697-6.
- Pereira, R., Sivinski, J., y Teal, P. E. A. (2009). Influence of methoprene and dietary protein on male *Anastrepha suspensa* (Diptera:Tephritidae) mating aggregations. *Journal of Insect Physiology* 55, 328-335. doi:10.1016/j.jinsphys.2008.12.010.
- Pereira, R., Yuval, B., Liedo, P., Teal, P. E. A., Shelly, T. E., Mcinnis, D. O., et al. (2013). Improving sterile male performance in support of programmes integrating the sterile insect technique against fruit flies. *Journal of Applied Entomology* 137, 178-190. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01664.x.
- Pereira, R., Yuval, B., Liedo, P., Teal, P., Shelly, T., McInnis, D. O., et al. (2021). «Improving post-factory performance of sterile male fruit flies in support of the sterile insect technique», en *Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management* (Boca Raton, Florida, USA: CRC Press), 631-656.
- Perez-Staples, D., Díaz-Fleischer, F., Montoya, P., y Vera, M. (2019). *Area-wide management of fruit fly pests*. CRC Press.
- Perez-Staples, D., Harmer, A. M. T., Collins, S. R., y Taylor, P. W. (2008). Potential for pre-release diet supplements to increase the sexual performance and longevity of male Queensland fruit flies. *Agricultural and Forest Entomology* 10, 255-262. doi:10.1111/j.1461-9563.2008.00385.x.
- Perez-Staples, D., Prabhu, V., y Taylor, P. W. (2007). Post-teneral protein feeding enhances sexual performance of Queensland fruit flies. *Physiological Entomology* 32, 225-232. doi:10.1111/j.1365-3032.2007.00568.x.
- Perkin, L. C., Perez, J. L., y Suh, C. P. (2021). The identification of boll weevil, *Anthonomus grandis grandis* (Coleoptera:Curculionidae), genes involved in pheromone production and pheromone biosynthesis. *Insects* 12, 893. doi:https://doi.org/10.3390/insects12100893.
- Piesik, D., Lemńczyk, G., Skoczek, A., Lamparski, R., Bocianowski, J., Kotwica, K., et al. (2011). Fusarium infection in maize: Volatile induction of infected and neighboring uninfected plants has the potential to attract a pest cereal leaf beetle, *Oulema melanopus*. *Journal of Plant Physiology* 168, 1534-1542. doi:10.1016/j.jplph.2011.01.032.

- Piesik, D., Pańka, D., Jeske, M., Wenda-Piesik, A., Delaney, K. J., y Weaver, D. K. (2013). Volatile induction of infected and neighbouring uninfected plants potentially influence attraction/repellence of a cereal herbivore. *Journal of Applied Entomology* 137, 296-309. doi:10.1111/j.1439-0418.2012.01742.x.
- Prabhu, V., Perez-Staples, D., y Taylor, P. W. (2008). Protein: Carbohydrate ratios promoting sexual activity and longevity of male Queensland fruit flies. *Journal of Applied Entomology* 132, 575-582. doi:10.1111/j.1439-0418.2007.01265.x.
- Prezotto, L. F., Perondini, A. L. P., Hernández-Ortiz, V., Frías, D., y Selivon, D. (2019). What can integrated analysis of morphological and genetic data still reveal about the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex? *Insects* 10. doi:10.3390/insects10110408.
- Quilici, S., Schmitt, C., Vidal, J., Franck, A., y Deguine, J. P. (2013). Adult diet and exposure to semiochemicals influence male mating success in *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 137, 142-153. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01650.x.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.
- Raghu, S., y Clarke, A. (2003). Spatial and temporal partitioning of behaviour by adult dacines: direct evidence for methyl eugenol as a mate rendezvous cue for *Bactrocera cacuminata*. *Physiological entomology* 28, 175-184.
- Reddy, G. V. P., y Guerrero, A. (2004). Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science* 9, 253-261. doi:10.1016/j.tplants.2004.03.009.
- Rehman, F., Khan, F. ., y Badruddin, S. M. . (2012). «Role of phenolics in plant defense against insect herbivory», en *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives*, eds. M. Srivastava, L. Khemani, y S. Srivastava (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 309-313. doi:10.1007/978.
- Reinecke, A., y Hilker, M. (2014). *Plant semiochemicals-perception and behavioural responses by insects*. doi:10.1002/9781118472507.ch4.
- Reinecke, A., Ruther, J., y Hilker, M. (2002). The scent of food and defence: Green leaf volatiles and toluquinone as sex attractant mediate mate finding in the European cockchafer *Melolontha melolontha*. *Ecology Letters* 5, 257-263. doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00318.x.
- Rings, A., y Goodwin, S. F. (2019). To court or not to court – a multimodal sensory decision in *Drosophila* males. *Current Opinion in Insect Science* 35, 48-53. doi:10.1016/j.cois.2019.06.009.
- Rizzolo, A., Polesello, A., y Polesello, S. (1992). Use of headspace capillary GC to study the development of volatile compounds in fresh fruit. *Journal of High Resolution Chromatography* 15, 472-477. doi:https://doi.org/10.1002/jhrc.1240150713.

- Rocca, J. R., Nation, J. L., Strekowski, L., y Battiste, M. A. (1992). Comparison of volatiles emitted by male caribbean and mexican fruit flies. *Journal of Chemical Ecology* 18, 223-244. doi:10.1007/BF00993755.
- Roriz, A. K. P., y Joachim-Bravo, I. S. (2013). The relevance of age and nutritional status on the mating competitiveness of medfly males (Diptera: Tephritidae). *Zoologia* 30, 506-512. doi:10.1590/S1984-46702013000500006.
- Ruiz, M. J., Juárez, M. L., Alzogaray, R. A., Arrighi, F., Arroyo, L., Gastaminza, G., et al. (2015). Oviposition behaviour and larval development of *Anastrepha fraterculus* from Argentina in citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 157, 198-213. doi:10.1111/eea.12357.
- Ruiz, M. J., Juárez, M. L., Alzogaray, R. A., Arrigui, F., Arroyo, L., Gastaminza, G., et al. (2014). Toxic Effect of citrus peel constituents on *Anastrepha fraterculus* Wiedemann and *Ceratitis capitata* Wiedemann immature stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 10084-10091.
- Ruiz, M. J., Juárez, M. L., Jofré Barud, F., Goane, L., Valladares, G. A., Bachmann, G. E., et al. (2021). Lemon and *Schinus polygama* essential oils enhance male mating success of *Anastrepha fraterculus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 0-3. doi:10.1111/eea.13005.
- Rull, J., Brunel, O., y Mendez, M. E. (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. doi:10.1603/0022-0493-98.5.1510.
- Ruther, J., Reinecke, A., Tolasch, T., y Hilker, M. (2001). Make love not war: A common arthropod defence compound as sex pheromone in the forest cockchafer *Melolontha hippocastani*. *Oecologia* 128, 44-47. doi:10.1007/s004420100634.
- Ryan, M. J. (1990). Sexual selection, sensory systems and sensory exploitation. *Oxford surveys in evolutionary biology* 7, 157-195.
- Ryner, L. ., Goodwin, S. ., Castrillon, D. ., Anand, A., Vilella, A., Baker, B. ., et al. (1996). Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the fruitless gene. *Cell* 87, 1079-1089.
- Salvatore, A., Borkosky, S., Willink, E., y Bardón, A. (2004). Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitis capitata*. *Journal of Chemical Ecology* 30, 323-333. doi:10.1023/B:JOEC.0000017980.66124.d1.
- Salvemini, M., Polito, C., y Saccone, G. (2010). fruitless alternative splicing and sex behaviour in insects: An ancient and unforgettable love story? *Journal of Genetics* 89, 287-299. doi:10.1007/s12041-010-0040-z.
- Sarfraz, M., Dosdall, L. M., y Keddle, B. A. (2005). Spinosad: a promising tool for integrated pest management. *Outlooks on Pest Management* 16, 78-84.
- Scannapieco, A. C., Conte, C. A., Rivarola, M., Wulff, J. P., Muntaabski, I., Ribone, A., et al. (2020). Transcriptome analysis of *Anastrepha fraterculus* sp. 1 males, females, and embryos: insights into development, courtship, and reproduction. *BMC Genetics* 21. doi:10.1186/s12863-020-00943-2.

- Schröder, R., y Hilker, M. (2008). The relevance of background odor in resource location by insects: A behavioral approach. *BioScience* 58, 308-316. doi:10.1641/B580406.
- Schultzhaus, J. N., Saleem, S., Iftikhar, H., y Carney, G. E. (2017). The role of the *Drosophila* lateral horn in olfactory information processing and behavioral response. *Journal of Insect Physiology* 98, 29-37. doi:10.1016/j.jinsphys.2016.11.007.
- Schuman, M. C., y Baldwin, I. T. (2016). The layers of plant responses to insect herbivores. *Annual Review of Entomology* 61, 373-394. doi:10.1146/annurev-ento-010715-023851.
- Segura-León, O. L., Torres-Huerta, B., Estrada-Pérez, A. R., Cibrián-Tovar, J., Hernandez-Hernandez, F. de la C., Cruz-Jaramillo, J. L., et al. (2022). Identification of candidate chemosensory gene families by head transcriptomes analysis in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Molecular Sciences* 23. doi:10.3390/ijms231810531.
- Segura, D. F., Belliard, S. A., Vera, M. T., Bachmann, G. E., Ruiz, M. J., Jofre-Barud, F., et al. (2018). Plant chemicals and the sexual behavior of male Tephritid fruit flies. *Annals of the Entomological Society of America* 111, 239-264. doi:10.1093/aesa/say024.
- Segura, D. F., Cáceres, C., Vera, M. T., Wornoyaporn, V., Islam, A., Teal, P. E. A., 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, 75-84. doi:10.1111/j.1570-7458.2009.00830.x.
- Segura, D. F., Utgés, M. E., Liendo, M. C., Rodríguez, M. F., Devescovi, F., Vera, M. T., et al. (2013). Methoprene treatment reduces the pre-copulatory period in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) sterile males. *Journal of Applied Entomology* 137, 19-29. doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01534.x.
- Segura, D., Petit-Marty, N., Sciurano, R., Vera, T., Calcagno, G., Allinghi, A., et al. (2007). Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 90, 154-162. doi:10.1653/0015-4040(2007)90[154:lboafd]2.0.co;2.
- Serrão, J. E., Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., y Zanuncio, J. C. (2022). Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: A mini-review. *The Science of Nature* 109, 17.
- Sharifi, R., y Ryu, C. M. (2021). Social networking in crop plants: Wired and wireless cross-plant communications. *Plant Cell and Environment* 44, 1095-1110. doi:10.1111/pce.13966.
- Shelly, T. (2000). Flower-feeding affects mating performance in male oriental fruit flies *Bactrocera dorsalis*. *Ecological Entomology* 25, 109-114.
- Shelly, T. (2001a). Exposure to α -Copaene and α -Copaene-containing oils enhances mating success of male mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94, 497-502. doi:10.1603/0013-8746(2001)094[0497:etcacc]2.0.co;2.
- Shelly, T. (2001b). Feeding on methyl eugenol and *Fagraea berteriana* flowers increases long-range female attraction by males of the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 634-640.

- Shelly, T. (2001c). Feeding on papaya flowers enhances mating competitiveness of male oriental fruit flies, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 35, 41-47.
- Shelly, T. (2010). Effects of methyl eugenol and raspberry ketone/cue lure on the sexual behavior of *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology* 45, 349-361. doi:10.1303/aez.2010.349.
- 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, 303-315. doi:10.1023/B:JOIR.0000031532.29287.95.
- Shelly, T., y Dewire, A. L. (1994). Chemically mediated mating success in male oriental fruit flies (Diptera:Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87, 375-382. doi:https://doi.org/10.1093/aesa/87.3.375.
- Shelly, T. E. (2006). Aromatherapy and medfly SIT. *Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*, 59-69.
- Shelly, T. E. (2009). Exposure to grapefruits and grapefruit oil increases male mating success in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 41, 31-36. doi:10.1093/biomet/bpx009.
- Shelly, T. E. (2018). Sexual selection on leks: A fruit fly primer. *Journal of Insect Science* 18. doi:10.1093/jisesa/iey048.
- Shelly, T. E., Kennelly, S. S., y McInnis, D. O. (2002). Effect of adult diet on signaling activity, mate attraction, and mating success in male mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 85, 150-155. doi:10.1653/0015-4040.
- Shelly, T. E., y McInnis, D. O. (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. doi:10.1603/0022-0493-94.6.1413.
- Shelly, T. E., McInnis, D. O., 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, 846-853. doi:10.1093/jee/97.3.846.
- Shelly, T. E., 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, 155-158. doi:10.1111/j.0013-8703.2004.00180.x.
- Shelly, T. E., y Nishimoto, J. O. N. I. (2015). Exposure to the plant compound a-humulene reduces mating success in male Mediterranean fruit flies (Diptera :Tephritidae). doi:10.1093/aesa/sav008.
- Shelly, T. E., Rendon, P., Hernandez, E., Salgado, S., McInnis, D., Villalobos, E., et al. (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, 1132-1141. doi:10.1093/jee/96.4.1132.

- Shelly, T. E., y Villalobos, E. M. (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. doi:10.1016/j.anbehav.2003.08.029.
- Shelly, T., y Whittier, T. (1996). Mating competitiveness of sterile male mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in male-only releases. *Annals of the Entomological Society of America* 89, 754-758. doi:https://doi.org/10.1093/aesa/89.5.754.
- Siddique, S., perveen, Z., Nawaz, S., Shahzad, K., y Ali, Z. (2015). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of six species from family Myrtaceae. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 18, 950-956. doi:10.1080/0972060X.2014.935020.
- Silva, N., Dantas, L., Calisto, R., Faria, M. J., y Pereira, R. (2013). Improving an adult holding system for Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to enhance sterile male performance. *Journal of Applied Entomology* 137, 230-237. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01681.x.
- Singh, S. P., y Pal, R. K. (2008). Response of climacteric-type guava (*Psidium guajava* L.) to postharvest treatment with 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology* 47, 307-314. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.08.010.
- Sivinski, J., Aluja, M. M., Dodson, G., Freidberg, A., Headrick, D., Kaneshiro, K., et al. (1999). «Topics in the evolution of sexual behavior in the Tephritidae», en *Fruit Flies (Tephritidae)*, 752-792. doi:10.1201/9781420074468.ch28.
- Soares, F. D., Pereira, T., Maio Marques, M. O., y Monteiro, A. R. (2007). Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food Chemistry* 100, 15-21. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.061.
- Southon, R. J., Radford, A. N., y Sumner, S. (2020). Hormone-mediated dispersal and sexual maturation in males of the social paper wasp *Polistes lanio*. *Journal of Experimental Biology* 223, 1-9. doi:10.1242/jeb.226472.
- Steck, G. J. (1991). Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 84, 10-28.
- Steck, G. J. (1999). Taxonomic status of *Anastrepha fraterculus*. Vienna, Austria.
- Stengl, M., Zintl, R., De Vente, J., y Nighorn, A. (2001). Localization of cGMP immunoreactivity and of soluble guanylyl cyclase in antennal sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Cell and Tissue Research* 304, 409-421. doi:10.1007/s004410000336.
- Stevenson, P. C., Nicolson, S. W., y Wright, G. A. (2017). Plant secondary metabolites in nectar: impacts on pollinators and ecological functions. *Functional Ecology* 31, 65-75. doi:10.1111/1365-2435.12761.
- Stökl, J., y Steiger, S. (2017). Evolutionary origin of insect pheromones. *Current Opinion in Insect Science* 24, 36-42. doi:10.1016/j.cois.2017.09.004.
- Tan, K., y Nishida, R. (1996). Sex pheromone and mating competition after methyl eugenol

- consumption in the Bactrocera dorsalis complex*. CRC Press.
- Tan, K., Nishida, R., Jang, E., y Shelly, T. (2014). «Pheromones, male lures, and trapping of Tephritid fruit flies», en *Trapping and the detection, control, and regulation of Tephritid fruit flies: lures, area-wide programs, and trade implications* (Springer Science+Business Media Dordrecht), 15-74. doi:10.1007/978-94-017-9193-9_2.
- Tan, K., Tokushima, I., Ono, H., y Nishida, R. (2011). Comparison of phenylpropanoid volatiles in male rectal pheromone gland after methyl eugenol consumption, and molecular phylogenetic relationship of four global pest fruit fly species: *Bactrocera invadens*, *B. dorsalis*, *B. correcta* and . *Chemoecology* 21, 25-33.
- Taylor, P. W., Pérez-Staples, D., Weldon, C. W., Collins, S. R., Fanson, B. G., Yap, S., et al. (2013). Post-teneral nutrition as an influence on reproductive development, sexual performance and longevity of Queensland fruit flies. *Journal of Applied Entomology* 137, 113-125. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01644.x.
- Teal, P. E. A., Gavilanez-Slone, J. M., y Dueben, B. D. (2004). Effects of sucrose in adult diet on mortality of males of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 87, 487-491. doi:10.1653/0015-4040.
- Teal, P. E. A., Gomez-Simuta, Y., Dueben, B. D., Holler, T. C., y Olson, S. (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: From Research to Field Implementation*, 163-173. doi:10.1007/978-1-4020-6059-5_14.
- Teal, P. E. A., Pereira, R., Segura, D. F., Haq, I., Gómez-Simuta, Y., Robinson, A. S., et al. (2013). Methoprene and protein supplements accelerate reproductive development and improve mating success of male tephritid flies. *Journal of Applied Entomology* 137, 91-98. doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01606.x.
- Teixeira, I. (2018). Silenciamento dos genes fruitless e period: efeitos no comportamento locomotor e reprodutivo de *Anastrepha fraterculus* sp. 1 (Diptera, Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad de São Paulo.
- Therneau, T. M., y Grambsch, P. M. (2000). *Modeling survival data: Extending the cox model*. Springer, New York.
- Thompson, G. D., Dutton, R., y Sparks, T. C. (2000). Spinosad - A case study: An example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science* 56, 696-702. doi:10.1002/1526-4998.
- Tiwari, R. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science Volume* 3, 153-159. doi:10.1007/978-81-322-2401-3_11.
- Tokushima, I., Orankanok, W., Tan, K., Ono, H., y Nishida, R. (2010). Accumulation of phenylpropanoid and sesquiterpenoid volatiles in male rectal pheromonal glands of the guava fruit fly, *Bactrocera correcta*. *Journal of Chemical Ecology* 36, 1327-1334.
- Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., y Guedes, R. N. C. (2015). Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere* 124, 103-109. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.038.

- Torson, A. S., Dong, Y. W., y Sinclair, B. J. (2020). Help, there are «omics» in my comparative physiology! *Journal of Experimental Biology* 223, 1-10. doi:10.1242/jeb.191262.
- Tumlinson, J. H. (2014). The importance of volatile organic compounds in ecosystem functioning. *Journal of Chemical Ecology* 40, 212-213. doi:10.1007/s10886-014-0399-z.
- Utgés, M. E., Vilardi, J. C., Oropeza, A., Toledo, J., y Liedo, P. (2013). Pre-release diet effect on field survival and dispersal of *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 137, 163-177. doi:10.1111/j.1439-0418.2011.01663.x.
- Vanaphan, N., Dauwalder, B., y Zufall, R. A. (2012). Diversification of takeout, a male-biased gene family in *Drosophila*. *Gene* 491, 142-148. doi:10.1016/j.gene.2011.10.003.
- Vaníčková, L., Břízová, R., Pompeiano, A., Ferreira, L. L., de Aquino, N. C., de Farias Tavares, R., et al. (2015). Characterisation of the chemical profiles of Brazilian and Andean morphotypes belonging to the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, tephritidae). *ZooKeys* 2015, 193-209. doi:10.3897/zookeys.540.9649.
- Vaníčková, L., Do Nascimento, R. R., Hoskovec, M., Ježková, Z., Břízová, R., Tomčala, A., 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, 7168-7176. doi:10.1021/jf301474d.
- Vera, M. T., Ruiz, M. J., Oviedo, A., Abraham, S., Mendoza, M., Segura, D. F., et al. (2013). Fruit compounds affect male sexual success in the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae). *Journal of Applied Entomology* 137, 2-10. doi:10.1111/j.1439-0418.2010.01516.x.
- Voelckel, C., y Jander, G. (2014). *Insect-Plant Interactions*. First Edit. , ed. G. Voelckel, Claudia; Jander Wiley-Blackwell doi:10.1002/9781444339956.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., et al. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling and Behavior* 7. doi:10.4161/psb.21663.
- Warburg, M. S., y Yuval, B. (1997). Effects of energetic reserves on behavioral patterns of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 112, 314-319. doi:10.1007/s004420050314.
- Wasserman, S. L., y Itagaki, H. (2003). The olfactory responses of the antenna and maxillary palp of the fleshfly, *Neobellieria bullata* (Diptera: Sarcophagidae), and their sensitivity to blockage of nitric oxide synthase. *Journal of Insect Physiology* 49, 271-280. doi:10.1016/S0022-1910(02)00288-3.
- Waterman, P. G. (1992). *Roles for secondary metabolites in plants*. , eds. D. . Chadwick y J. Whelan Ciba Foundation doi:10.1002/9780470514344.ch15.
- Wee, S. L., Chinvinijkul, S., Hong, K., y Ritsuo, T. (2018a). A new and highly effective male lure for the guava fruit fly *Bactrocera correcta*. *Journal of Pest Science* 91, 691-698. doi:10.1007/s10340-017-0936-y.

- Wee, S., Munir, M., y Hee, A. (2018b). Attraction and consumption of methyl eugenol by male *Bactrocera umbrosa* Fabricius (Diptera:Tephritidae) promotes conspecific sexual communication and mating performance. *Bulletin of Entomological Research* 108, 116-124.
- Wee, S., y Tan, K. (2005). Female sexual response to male rectal volatile constituents in the fruit fly, *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae). *Applied Entomology and Zoology* 40, 365-372.
- White, I., y Elson-Harris, M. (1992). *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. Wallingford, UK: CAB International.
- Whitehead, S. R., y Bowers, M. D. (2013). Evidence for the adaptive significance of secondary compounds in vertebrate-dispersed fruits. *American Naturalist* 182, 563-577. doi:10.1086/673258.
- Whittier, T. S., Nam, F. Y., Shelly, T. E., y Kaneshiro, K. Y. (1994). Male courtship success and female discrimination in the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior* 7, 159-170. doi:10.1007/BF01990078.
- Wyatt, G. R., y Davey, K. G. (1996). *Cellular and Molecular Actions of Juvenile Hormone. II. Roles of Juvenile Hormone in Adult Insects*. doi:10.1016/S0065-2806(08)60030-2.
- Xu, H., y Turlings, T. C. J. (2018). Plant volatiles as mate-finding cues for insects. *Trends in Plant Science* 23, 100-111. doi:10.1016/j.tplants.2017.11.004.
- Yamamoto, D. (2008). Brain sex differences and function of the fruitless gene in *Drosophila*. *Journal of neurogenetics* 22, 309-332. doi:10.1080/01677060802298491.
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., y Oshlack, A. (2010). Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology* 11. doi:10.1186/gb-2010-11-2-r14.
- Yu, H. Z., Huang, Y. L., Lu, Z. J., Zhang, Q., Su, H. N., Du, Y. M., et al. (2021). Inhibition of trehalase affects the trehalose and chitin metabolism pathways in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Insect Science* 28, 718-734. doi:10.1111/1744-7917.12819.
- Yuval, B., Kaspi, R., Shloush, S., y Warburg, M. S. (1998). Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecological Entomology* 23, 211-215. doi:10.1046/j.1365-2311.1998.00118.x.
- 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, 115-122. doi:10.1653/0015-4040.
- Zeni, V., Benelli, G., Campolo, O., Giunti, G., Palmeri, V., Maggi, F., et al. (2021). Toxics or lures? Biological and behavioral effects of plant essential oils on tephritidae fruit flies. *Molecules* 26, 1-42. doi:10.3390/molecules26195898.
- Zhang, D. W., Wang, H. J., Jin, X., Pan, B. Y., Zeng, B. P., Xiao, Z. J., et al. (2019a). Knockdown of glycogen phosphorylase and glycogen synthase influences expression of chitin synthesis genes of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22, 786-794. doi:10.1016/j.aspen.2019.06.006.

- Zhang, D. W., Xiao, Z. J., Zeng, B. P., Li, K., y Tang, Y. L. (2019b). Insect behavior and physiological adaptation mechanisms under starvation stress. *Frontiers in Physiology* 10, 1-8. doi:10.3389/fphys.2019.00163.
- Zunjarrao, S. S., Tellis, M. B., Joshi, S. N., y Joshi, R. S. (2020). «Plant-Insect interaction: The saga of molecular coevolution», en *Reference Series in Phytochemistry*, eds. J. Mérillon y K. Ramawat (Springer Nature Switzerland), 19-45. doi:10.1007/978-3-319-96397-6_42.
- Zur, T., Nemny-Lavy, E., Papadopoulos, N. T., y Nestel, D. (2009). Social interactions regulate resource utilization in a Tephritidae fruit fly. *Journal of Insect Physiology* 55, 890-897. doi:10.1016/j.jinsphys.2009.05.013.

