



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Competitividad sexual de machos de
Anastrepha ludens Loew (Diptera: Tephritidae)
al exponerlos al aroma del aceite esencial de dos
hospederos preferenciales

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

SANTIAGO RAFAEL MORATÓ SÁNCHEZ DE TAGLE

DIRECTOR DE TESIS:
MARTÍN R. ALUJA SCHUNEMAN HOFER, Ph.D.

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del Alumno

Morató
Sánchez de Tagle
Santiago Rafael
55 94 97 69
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biólogo
40509939-9

2. Datos del tutor

Dr.
Martín Ramón
Aluja
Schuneman Hofer

3. Datos del sinodal 1

Dr.
César
Domínguez
Pérez Tejada

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Alejandro
Córdoba
Aguilar

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Margarita
Martínez
Gómez

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Alejandro Ariel
Ríos
Chelén

7. Datos del trabajo escrito

Competitividad sexual de machos de *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae) al exponerlos al aroma del aceite esencial de dos hospederos preferenciales
51p.
2010

Para la realización del presente estudio, se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto "Paso Número Tres en Nuestro Esfuerzo por Armar el Rompecabezas de la Biología Reproductiva de las Moscas de la Fruta y sus Enemigos Naturales" (46846-Q) y el Sistema Nacional de Investigadores (SNI), así como de la Campaña Nacional contra Moscas de la Fruta mediante los Convenios de Cooperación Científica entre el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y el Instituto de Ecología (INECOL) 2008 y 2009.

El contenido de esta tesis está en proceso de ser publicado.

A mis padres, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Martín Aluja, por la dirección del presente trabajo y por la confianza depositada en mí tanto a nivel académico como personal para la realización del mismo.

Al Dr. Todd Shelly, por permitirme aplicar su idea en este trabajo y por las sugerencias para llevarlo a cabo.

A la M. en C. Andrea Birke Biewendt, por el invaluable apoyo académico y administrativo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Alberto Anzures, por su apoyo constante al realizar este trabajo y por los comentarios y sugerencias al mismo.

Al M. en C. José Arredondo Gordillo, por su amable asistencia, proveyendo las moscas estériles utilizadas en este trabajo desde la planta MOSCAFRUT en Metapa, Chiapas.

Al Ing. Agr. Emilio Acosta, por las colectas de material biológico para la realización de este trabajo.

A la Biól. Delia Garibay, por su valioso apoyo durante gran parte de las observaciones y por transmitirme lo básico para poder trabajar con las moscas.

A la M. en C. Larissa Guillén, por su apoyo personal y académico durante mi estancia en Xalapa.

Al CONACyT (SNI) y a la Campaña Nacional contra las Moscas de la Fruta, por la beca otorgada.

A todos los integrantes del laboratorio de la Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores, por compartir el día a día durante mi estancia en Xalapa.

A todos mis profesores de la Facultad de Ciencias, por consolidar mi formación académica y personal.

A todos mis amigos y todas las personas que han estado a mi lado en este proceso, gracias por aguantarme y darme ánimos para seguir adelante.

A mi familia por todo el cariño y apoyo incondicional.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	7
3.1 Biología de <i>Anastrepha ludens</i>	7
3.1.1 Ciclo de vida.....	7
3.1.2 Comportamiento sexual.....	7
3.2 Selección sexual.....	10
3.2.1 La <i>elección femenina</i> y su relación con el uso de feromonas sexuales en insectos.....	12
3.3 Efectos del hospedero sobre la competitividad sexual de insectos fitófagos.....	15
3.3.1 “Aromaterapia” en Moscas de la Fruta (<i>Tephritidae</i>).....	18
4. OBJETIVOS.....	21
5. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Obtención del material biológico.....	22
6.2 Experimentos realizados.....	23
6.3 Aplicación del tratamiento.....	25
6.4 Observación de cópulas.....	26
6.5 Análisis estadísticos.....	28
7. RESULTADOS.....	29
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIONES.....	42
10. LITERATURA CITADA.....	44

1. RESUMEN

Recientes investigaciones, realizadas en su mayoría con la Mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata* Wiedemann), han mostrado que la competitividad sexual de los machos se incrementa sustancialmente al exponerlos al aroma de sus hospederos o al de la raíz de jengibre, mediante el uso de aceites esenciales de los mismos. Esta técnica, la cual se ha denominado "aromaterapia", ha sido probada en laboratorio con machos estériles, los cuales son utilizados como parte de lo que se conoce como "Control Autocida" o "Técnica del Insecto Estéril". El propósito de esta investigación fue determinar si la competitividad sexual de machos de la Mosca Mexicana de la Fruta (*Anastrepha ludens* Loew), también se incrementa al exponerlos al aroma del aceite esencial de dos hospederos preferenciales: toronja (*Citrus paradisi* Macfad.) y naranja agria (*Citrus aurantium* L.). Se llevaron a cabo tres pruebas distintas dentro de una jaula de 3 x 3 x 3 m. colocada dentro de un laboratorio de simulación ambiental: 1) Observación de número y duración de cópulas obtenidas por machos asilvestrados (individuos silvestres mantenidos en laboratorio por un máximo de tres generaciones, utilizando un hospedero natural como medio de desarrollo larvario, en este caso toronja) expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de naranja; 2) observación de número y duración de cópulas obtenidas por machos asilvestrados expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de toronja, y 3) observación de número y duración de cópulas obtenidas por machos asilvestrados y estériles, expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de toronja. Los resultados obtenidos indican que los machos asilvestrados expuestos al aroma de aceite esencial de toronja obtuvieron significativamente más cópulas que los machos asilvestrados no expuestos cuando hubo competencia directa entre ellos (experimento #2). Sin embargo, este efecto se diluyó al introducir individuos estériles en el ensayo (experimento #3). No hubo diferencias significativas en el número de cópulas obtenidas por machos expuestos al aroma de aceite esencial de naranja (experimento #1). Tampoco hubo diferencias significativas en la duración de las cópulas en ninguno de los ensayos. Se discute la posibilidad de que el efecto del aceite de toronja sobre la competitividad sexual de los machos asilvestrados no sea un efecto *per se*, tal y como sucede con la Mosca del Mediterráneo, sino que más bien el efecto esté relacionado con la experiencia temprana de las hembras hacia el aroma de su hospedero de origen (toronja), debido a que pudieron haber tenido contacto con él al emerger del pupario que podría contener trazas de toronja en su superficie y por lo tanto estarían sesgadas hacia ese aroma.

Palabras clave: Tephritidae, *Anastrepha ludens*, competitividad sexual, aroma, volátiles, hospedero.

2. INTRODUCCIÓN

Sabemos muy poco acerca de cómo la conducta sexual de los insectos fitófagos responde a estímulos provocados por sus hospederos y cómo estos últimos repercuten en sus esfuerzos por conseguir pareja y reproducirse. Generalmente, las interacciones entre las plantas hospederas y la conducta sexual de los insectos fitófagos parecen ser parte de las estrategias utilizadas por los machos para optimizar las oportunidades de apareamiento incrementando los encuentros con las hembras, o bien, de estrategias utilizadas por las hembras para obtener acceso a los recursos, ya sea como sitio de alimentación u oviposición (Landolt & Phillips, 1997). Se tiene documentado ambos fenómenos ocurren en varios órdenes de insectos fitófagos tales como Diptera, Coleoptera y Lepidoptera (Wood, 1982; Landolt *et al.*, 1994; Shelly *et al.*, 2007). En los dípteros, este fenómeno se ha demostrado en miembros de las familias Tephritidae y Drosophilidae (Bartelt *et al.*, 1986; Shelly & Villalobos, 2004).

La Mosca Mexicana de la Fruta, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae), es un insecto fitófago altamente polífago que utiliza como hospedero para el desarrollo larvario, los frutos de aproximadamente 60 especies de plantas pertenecientes a 14 familias (Aluja, 1993). Aunque sus hospederos nativos son el zapote amarillo (*Casimiroa greggii* (S. Watson) Chiang) y el zapote blanco (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex.) (ambas Rutaceae), entre sus hospederos predilectos se encuentran especies introducidas como los cítricos (Rutaceae), destacando la toronja (*Citrus paradisi* Macfad.) y la naranja agria (*C. aurantium* L.), y en menor medida, la naranja dulce (*C. sinensis* (L.) Osbeck) (Birke *et al.*, 2006; Aluja *et al.*, 2009). *Anastrepha ludens* se distribuye por todo México, alcanzando el sur de los Estados Unidos hacia el norte y países centroamericanos como Guatemala y Costa Rica (Hernández-Ortiz & Aluja, 1993).

Debido a que algunos de los frutos hospederos de *A. ludens* son de gran valor comercial, esta especie es considerada como una de las plagas de mayor interés cuarentenario y de importancia económica en la fruticultura de México y varios otros países de Centroamérica, junto con *A. obliqua* (Macquart) y *A. striata* (Schiner) (Aluja, 1994; Aluja & Mangan, 2008). Por lo anterior, diversos métodos han sido implementados para controlar su alta tasa reproductiva, entre los cuales destacan el control mecánico cultural (e.g., enterrar los frutos caídos), el control químico (e.g., uso de pesticidas) y el control biológico (Aluja, 1993).

El control biológico consiste en el uso de un depredador, un parasitoide o un patógeno natural de la plaga para controlar su tasa de reproducción (Aluja, 1993). Asimismo, existe un método conocido como "Técnica del Insecto Estéril" (TIE), el cual consiste en liberar en campo machos criados masivamente en laboratorio, esterilizados mediante radiación gamma para que copulen con las hembras silvestres y al transferirle espermatozoides inviables, se controle la tasa reproductiva de la plaga (Dyck *et al.*, 2005). La TIE se encuentra entre los métodos más "amigables" al ambiente, ya que no se introducen agentes exóticos en el medio ni nuevo material genético dentro de las poblaciones (Hendrichs *et al.*, 2002; Dyck *et al.*, 2005). Por lo anterior, esta técnica es considerada oficialmente por la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (IPPC) como un tipo de control biológico o "biorracional" y forma parte de los programas de manejo integrado de insectos plaga (Dyck *et al.*, 2005).

La cría masiva de insectos y su posterior esterilización es de vital importancia para la TIE. Sin embargo, se tiene bien documentado que la cría masiva de moscas de la fruta bajo condiciones de laboratorio modifica sustancialmente tanto propiedades fisiológicas como conductuales de los individuos (Cayol, 2000; Orozco-Dávila *et al.*, 2007). Diversos estudios sugieren que lo anterior puede deberse a uno o varios de los siguientes

factores: las condiciones de hacinamiento extremo en que son criados (Knoppien, 1987; Kim *et al.*, 1992; Hirsch & Tompkins, 1994; Gaskin *et al.*, 2002; Diaz-Fleischer *et al.*, 2009), la dieta con que son alimentados (Yuval *et al.*, 1998), la presión de selección a la que son enfrentadas como parte del proceso de cría masiva (i.e., escoger machos con sólo ciertas características) (Zurlini & Robinson, 1980), o bien, el número de generaciones que han transcurrido desde el establecimiento de la primera colonia en el laboratorio, lo que podría generar endogamia (Cayol, 2000). Asimismo, está documentado que la radiación a la que las moscas de la fruta son sometidas para esterilizarlas, es otro factor muy importante que repercute negativamente tanto en su comportamiento como en su fisiología (e.g., habilidad para volar, emergencia de los individuos, supervivencia, conducta sexual, entre otros) (Walder & Calkins, 1993; Lux *et al.*, 2002; Toledo *et al.*, 2004; Bakri *et al.*, 2005; Rull *et al.*, 2007).

Uno de los atributos que se ven mayormente afectados durante la cría masiva y la exposición a la radiación es la competitividad sexual de los machos, que disminuye notablemente en comparación con la de los individuos silvestres (Rull *et al.*, 2005). La 'competitividad sexual' masculina, en este caso, se refiere principalmente a la facilidad con que las hembras silvestres aceptan a los machos estériles como pareja frente a los machos silvestres (FAO/IAEA/USDA, 2003). El éxito de la TIE depende básicamente de que los machos estériles liberados en el campo sean igual o más competitivos sexualmente que los machos silvestres, es decir, que obtengan cópulas en un número similar o mayor en comparación con los machos silvestres para de esta forma controlar la reproducción de la población (Calkins & Ashley, 1989; McInnis *et al.*, 2006). Por lo anterior, se requiere mejorar la competitividad sexual de los machos criados masivamente en laboratorio para que la TIE tenga éxito.

Diversos estudios han demostrado que la competitividad sexual de los machos de moscas de la fruta (*Tephritidae*) puede ser mejorada de distintas formas, tales como iniciar una nueva colonia a partir de individuos silvestres (Rull & Barreda-Landa, 2007), “refrescando” la cepa establecida en laboratorio con individuos silvestres (Dyck *et al.*, 2005; Rull & Barreda-Landa, 2007), mejorando la dieta (Aluja *et al.*, 2001; Shelly & Kennelly, 2002; Shelly *et al.*, 2002; Shelly & McInnis, 2003), reduciendo las dosis de irradiación a las que son sometidos para esterilizarlos (Toledo *et al.*, 2004; Rull *et al.*, 2007), o bien, mejorando las condiciones ambientales en las que se les mantiene (McInnis *et al.*, 2002), lo cual se conoce como “enriquecimiento ambiental” e incluye una combinación tanto de interacción social como de estimulación inanimada (Dukas & Mooers, 2003; Diaz-Fleischer *et al.*, 2009).

Investigaciones recientes, realizadas en su mayoría con la Mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* Wiedemann, han demostrado que una forma de incrementar la capacidad de los machos para obtener pareja y copular, es decir, aumentar su competitividad sexual, consiste en exponerlos al aroma de sus hospederos, ya sea mediante frutos, árboles o aceites esenciales de estos (Shelly & Villalobos, 2004). Este método ha sido denominado “aromaterapia” (Shelly *et al.*, 2004; Briceño *et al.*, 2007; Shelly *et al.*, 2007; Shelly *et al.*, 2007). En el presente estudio he abordado la pregunta de si esta técnica puede ser aplicable en *A. ludens*. Si bien, *C. capitata* y *A. ludens* difieren de manera importante en algunas características biológicas y conductuales, también comparten algunos atributos importantes para este trabajo: ambas son fitófagas y utilizan los frutos como hospedero larvario, su sistema de apareamiento es el lek y utilizan una feromona sexual para atraer hembras y aparearse con ellas (Shelly & Whittier, 1997). Lo anterior, sugiere que al igual que como sucede en *C. capitata*, la competitividad sexual de los machos de *A. ludens* podría verse beneficiada al exponerlos

al aroma de su hospedero. En caso de que la hipótesis resultara verdadera, podría implementarse este tratamiento como complemento de la TIE, contribuyendo de esta forma con los esfuerzos realizados para controlar la plaga que afecta a las plantaciones de mango y cítricos de nuestro país.

3. ANTECEDENTES

3.1. Biología de *Anastrepha ludens*

3.1.1. Ciclo de vida

Anastrepha ludens presenta una metamorfosis completa u holometábola que se divide en cuatro etapas: huevecillo, larva, pupa y adulto (Aluja, 1993) (Figura 1). El ciclo de vida comienza en el momento en que una hembra grávida deposita paquetes de huevecillos en el fruto hospedero. La duración del estado de huevecillo es de aproximadamente 4 a 5 días. Las larvas eclosionadas se alimentan de la pulpa del fruto, pasando por tres estadios, que en conjunto tienen una duración aproximada de entre 25 y 30 días, dependiendo de las condiciones ambientales (Aluja, 1993). La alimentación de las larvas ocasiona una rápida putrefacción del fruto, provocando la caída temprana de éstos al suelo (Dyck *et al.*, 2005). Una vez que la larva se encuentra en el tercer estadio, abandona el fruto para enterrarse en el suelo, en donde pupa durante aproximadamente 15 días. El estadio anterior finaliza con la emergencia de las moscas, las cuales después de 15 días alcanzan la madurez sexual (Aluja, 1993).

3.1.2. Comportamiento sexual

El comportamiento sexual de *A. ludens* está relacionado íntimamente con el hospedero, alrededor del cual *A. ludens* pasa gran parte de su vida, ya que le brinda los recursos necesarios para llevar a cabo todas sus actividades (Aluja *et al.*, 2001). Entre estos recursos podemos mencionar: alimento (incluyendo

líquidos), sitios donde refugiarse y reposar, un sitio para llevar a cabo el cortejo y la cópula y finalmente, un sustrato de oviposición (Aluja *et al.*, 2000).

En *A. ludentis*, el cortejo lo llevan a cabo los machos de manera individual o en agrupaciones. En el segundo caso se congregan entre 3 y 10 machos (en ocasiones más) quienes defienden territorios (generalmente el envés de una hoja) de manera intensa. A estas agregaciones llegan las hembras, quienes escogen a los machos más aptos para copular. Dichas agrupaciones se conocen como *leks*, que se definen como “cualquier agregación de machos que las hembras visitan exclusivamente para aparearse” (Höglund & Alatalo, 1995). Se han sugerido cuatro criterios que distinguen a un lek “clásico” de otros sistemas de apareamiento (Bradbury, 1981):

- 1) No existe cuidado parental. Los machos no contribuyen nada a la siguiente generación, excepto gametos.
- 2) Existe una arena o *lek* que visitan las hembras y en la cual la mayoría de los apareamientos ocurren. Una arena es un sitio donde los machos se agregan y que no representa el hábitat utilizado normalmente por individuos de la especie para otras actividades como alimentación, reposo, etc.
- 3) Los sitios de despliegue de los machos no contienen recursos esenciales para las hembras exceptuando los machos. Entre los recursos que no existen, se encuentran el alimento, perchas, nidos, sustratos para oviposición, etc.
- 4) Las hembras tienen la oportunidad de seleccionar a una pareja cuando visitan la arena.

Al mismo tiempo que defienden un territorio empujando con el cuerpo a un intruso o invasor, también compiten entre ellos mediante la emisión de una feromona sexual con el propósito de atraer a las hembras, dispersándola en el aire por medio del movimiento intenso de las alas, lo cual produce a su vez llamados o “cantos” y también mediante deposiciones de la feromona sexual en la superficie de las hojas (Fig. 1A) (Aluja *et al.*, 2000). Las feromonas juegan un papel

determinante en la elección de pareja en *A. ludens*, siendo de especial importancia en la competitividad sexual de los machos (Nation, 1989). Asimismo, en los tefrítidos, la alimentación juega un papel determinante tanto en la calidad de la feromona como en su producción y tasa de liberación (Epsky & Heath, 1993). Una vez que las hembras se acercan a los machos, el cortejo también consiste en ciertos movimientos que realizan estos últimos caminando lateralmente sobre la hoja de un lado a otro de la hembra (Aluja *et al.*, 2000).

En *A. ludens*, la actividad sexual es de tipo crepuscular, entre las 17 y las 19 horas, cuando la intensidad de la luz empieza a decaer (Aluja *et al.*, 1983). El apareamiento en *Anastrepha* se lleva a cabo generalmente en el envés de las hojas del hospedero y algunas veces también en hojas de árboles no hospederos cercanos a éste (Burk, 1983; Malavasi *et al.*, 1983; Aluja & Birke, 1993) (Fig. 1B). La cópula de *A. ludens* dura alrededor de 165 minutos (Aluja *et al.*, 2000), aunque hay cópulas que se extienden más allá de lo que es requerido normalmente para la transferencia del esperma. Lo último es generalmente interpretado como un medio para evadir la competencia espermática (i.e., la competencia entre los eyaculados de machos diferentes para la fertilización de un conjunto determinado de huevos) y asegurar que la progenie sea del individuo que copuló (Parker, 1970). Hay varios factores que pueden afectar la duración de la cópula en los tefrítidos, como lo son la edad, el tamaño de los machos, el hospedero de origen y la calidad de la dieta con la que son alimentados los adultos (Field *et al.*, 1999; Aluja *et al.*, 2001; Aluja *et al.*, 2008; Perez-Staples *et al.*, 2008). Asimismo, recientemente se observó en *A. ludens*, que la duración de la cópula sostenida entre individuos de una misma población es mayor que la sostenida entre individuos de distintas poblaciones (Aluja *et al.*, 2009).



Figura 1. (A) Macho de *A. ludens* emitiendo feromona sexual. (B) Cópula de *A. ludens*.

Como se puede notar, el comportamiento sexual en *A. ludens* ha sido ampliamente estudiado por ser una especie económicamente importante (Birke et al., 2006). Sin embargo, aún quedan muchas dudas por resolver, y por ello, es necesario comprender mejor las interacciones de competencia entre machos y los criterios de elección femenina (Aluja et al., 2000). Lo anterior, permitirá seleccionar a los machos con las características que los hagan competitivos sexualmente frente a los machos silvestres, incrementando las posibilidades de éxito de la TIE (McInnis et al., 2002; Dyck et al., 2005).

3.2. Selección sexual

La mayor parte de la investigación que existe sobre selección sexual está enfocada en los patrones de comportamiento sexual y en sus consecuencias evolutivas. Sin embargo, la literatura que existe sobre los mecanismos bajo los que

opera la selección sexual, contiene información que igualmente puede ser aplicable en los programas de manejo integrado de plagas (Boake *et al.*, 1996).

Darwin notó que algunos caracteres de los individuos como colores sumamente llamativos, rasgos morfológicos como largas y vistosas colas, comportamientos complejos y conspicuos, o señales químicas como feromonas no tenían nada que ver con la “lucha por la existencia” (Darwin, 1859; Darwin, 1871). Él definió a estos caracteres como ‘caracteres sexuales secundarios’, proponiendo que evolucionaban bajo ‘selección sexual’ y no por ‘selección natural’. Su argumento para ello fue que parecían ser desventajosos con respecto a la supervivencia de los individuos y la selección sexual era responsable para el mantenimiento de esos rasgos en la población debido a que el portarlos confería ventajas reproductivas. Los individuos portadores de estas características eran capaces de obtener mayor número de cópulas y/o parejas, y dejar mayor descendencia en la próxima generación (Darwin, 1859).

La selección sexual tiene dos componentes principales: 1) la *selección intrasexual* o *competencia entre machos*, y 2) la *selección intersexual* o *elección femenina*. Según Darwin, las ‘armas’ tales como astas y cuernos en los machos evolucionan a través de *selección intrasexual* debido a la competencia entre los mismos para obtener acceso a las hembras (Darwin, 1871). Asimismo, los ornamentos en los machos evolucionan a través de la *selección intersexual*, es decir, de la presión que ejerce la elección de pareja realizada generalmente por las hembras, por lo cual se denomina como *elección femenina* (Darwin, 1871).

3.2.1. La *elección femenina* y su relación con el uso de feromonas sexuales en insectos.

Actualmente existe mucha evidencia que sugiere que las hembras eligen activamente a sus parejas y que dicha elección favorece rasgos conspicuos de los machos (Andersson & Iwasa, 1996). La valoración de una potencial pareja es promovida, en parte, a través de los beneficios obtenidos por escoger un individuo que de cierto modo es superior a los demás, asumiendo que esta 'superioridad' se traduce en descendencia más abundante o de mejor calidad (Johansson & Jones, 2007). Existen sistemas de apareamiento en los cuales los individuos obtienen beneficios directos por su elección (e.g., regalos nupciales, territorios o sitios de oviposición). Sin embargo, hay especies en las que los beneficios parecen ser indirectos, asumiéndose que los individuos escogen a su pareja debido a que porta ciertas características genéticas que favorecerán la adecuación de su progenie. Este caso suele presentarse en las especies que presentan cópulas extra-pareja o en sistemas de lek (Johansson & Jones, 2007). En un sistema de apareamiento de lek, como se presenta en *A. ludens*, los machos defienden territorios que no contienen recursos utilizados por las hembras. Además, los machos no proveen cuidado parental y las hembras visitan el lek solamente para encontrar a los machos y copular (Boake *et al.*, 1996). Dentro de las especies carentes de cuidado parental, los machos tienen una varianza más alta que las hembras en el éxito reproductivo, por lo que están bajo una presión de selección sexual más fuerte (Clutton-Brock, 1988). Esta afirmación significa que los machos que realizan los despliegues más atractivos (en términos de señales visuales, acústicas y químicas) se aparearán más frecuentemente y dejarán más descendencia, mientras que los menos atractivos lo harán rara vez o nunca (Boake *et al.*, 1996).

Existe evidencia de que en una gran variedad de taxa, ciertos rasgos de los machos pueden ser utilizados por las hembras como señales para evaluar su condición física y del mismo modo su potencial como pareja para que su progenie obtenga beneficios (Andersson & Iwasa, 1996). Trabajos recientes sugieren que en los insectos, las hembras utilizan las feromonas sexuales como un indicativo más confiable que las señales acústicas o visuales para evaluar el genotipo del macho antes de aparearse (Tregenza & Wedell, 2000; Penn, 2002). Una feromona sexual se define como 'cualquier sustancia que es liberada por un individuo, ya sea directamente por una estructura especializada o por medio de cambios en la química corporal y que promueva una variación en el comportamiento sexual de individuos de la misma especie para beneficio del individuo que la libera' (Johansson & Jones, 2007). Las señales de larga distancia que provocan que los miembros de la misma especie se acerquen, suelen ser en su mayoría acústicas o químicas. Una ventaja notable de este tipo de señales es que pueden viajar distancias que no son restringidas por el campo visual (Boake *et al.*, 1996).

En la cucaracha *Nauphoeta cinerea* (Olivier), las hembras utilizan las señales químicas para elegir a su pareja (Moore & Breed, 1986). Con base en dicha elección, las hembras obtienen beneficios indirectos al producir una progenie que alcanza la madurez sexual más rápidamente (Moore, 1994). En la mosca del vinagre *Drosophila serrata* Malloch, se ha visto que la preferencia de la hembra por la feromona de los machos está correlacionada con la adecuación de la progenie (Hine *et al.*, 2002).

Las señales para la valoración de pareja deben advertir la 'superioridad' del emisor, y es por esto que se espera que este tipo de señales varíen entre los diferentes individuos según su condición física. En el caso de las especies que

utilizan una feromona sexual para atraer a su pareja, la variación individual se refiere a que la feromona debe ser distinta ya sea en cantidad (i.e., total de feromona secretada en una emisión), calidad (i.e., que contenga los componentes en una proporción adecuada) o en la tasa de liberación (i.e., cuantas veces se libera la feromona en un tiempo determinado)(Johansson & Jones, 2007).

Las hembras de la mosca *Lutzomyia longipalpis* (Lutz y Neiva) prefieren aparearse con machos que invierten más tiempo en la emisión de feromonas y en los movimientos que realizan con las alas para dispersarla (Jones & Hamilton, 1998). Asimismo, la progenie resultante es más atractiva cuando las hembras se aparean con estos machos (Jones *et al.*, 1998).

Las preferencias en las hembras pueden surgir por una mutación que cambie las respuestas de éstas hacia algún aspecto conductual o morfológico de los machos. Sin embargo puede ocurrir lo contrario: un nuevo rasgo en los machos puede ser favorecido en las preferencias de las hembras debido a que éste ajusta o explota algún sesgo pre-existente en el sistema sensorial de la hembra. A este mecanismo se lo denomina 'explotación sensorial' (Ryan, 1998), y la evolución de señales que utilicen rasgos favorecidos en otros contextos pueden constituir una 'trampa sensorial' para la hembra (West-Eberhard, 1984).

Muchas feromonas de insectos fitófagos son estructuralmente similares a compuestos hallados en muchas plantas (Baker, 1989; Phelan, 1992; Landolt, 1997). Hay machos que pueden atraer a las hembras que están buscando sitios de alimentación y oviposición utilizando una feromona que mimetiza el olor del hospedero (Krebs & Dawkins, 1984; Phelan, 1992). Las feromonas sexuales de los machos de insectos fitófagos podrían estar relacionadas con los compuestos encontrados en las plantas porque las hembras deberían tener receptores para

reconocer dichos compuestos debido a que usan esas plantas como hospedero (i.e., sustrato de oviposición) (Baker, 1989). Por ejemplo, la feromona sexual de los machos de *C. capitata* contiene terpenoides y esteroides similares a muchos compuestos que son encontrados en sus hospederos (Baker *et al.*, 1985; Landolt *et al.*, 1992).

3.3. Efectos del hospedero sobre la competitividad sexual de insectos fitófagos

Históricamente, el interés por investigar la importancia de las plantas hospederas sobre el comportamiento sexual de insectos fitófagos ha sido muy grande. Los primeros trabajos de identificación de feromonas sexuales involucraron especies de escarabajos de troncos, principalmente de los géneros *Dendroctonus* e *Ips* (Coleoptera: Scolytidae), los cuáles también son de importancia económica por los daños que ocasionan a la industria maderera. En estos escarabajos, la biosíntesis de sus feromonas, así como su uso para atraer parejas, están íntimamente ligados a la interacción con los olores del hospedero (Wood, 1982).

La mayor parte de los encuentros sexuales ocurre en o cerca de recursos que son atractivos para las hembras, como lo es la planta hospedera en el caso de los insectos fitófagos (Thornhill & Alcock, 1983). Es más fácil para los machos encontrar a su pareja cerca de la planta hospedera, debido a que las hembras suelen visitarla para ovipositar. En las especies donde los machos utilizan una feromona sexual para atraer pareja, éstos la liberan en o cerca del hospedero debido a que puede ser una estrategia para indicar a las hembras la presencia de éste último, el cual es un recurso sumamente atractivo para ellas (Landolt, 1997). Por lo anterior, si las

hembras responden a la feromona sexual, entonces los machos tienen más oportunidades de aparearse al incrementarse el número de hembras en o cerca del hospedero (Landolt, 1997).

Los mecanismos por los cuales el hospedero afecta el comportamiento sexual de los insectos fitófagos no han sido profundamente investigados en la mayoría de los casos en donde se sabe que ocurre este fenómeno. Sin embargo, se sabe que existen tres estrategias que utilizan los insectos fitófagos para optimizar el apareamiento y la reproducción mediante el uso de una feromona sexual y la interacción con su hospedero: 1) Insectos que adquieren su feromona sexual directamente de los compuestos de la planta hospedera, 2) Insectos que producen o liberan su feromona sexual como respuesta a ciertos estímulos de la planta hospedera y 3) Insectos que liberan su feromona sexual y ésta actúa en conjunto con el aroma de la planta hospedera (Landolt & Phillips, 1997).

Dentro del primer grupo, los insectos adquieren del hospedero los químicos bioactivos que componen la feromona, o bien, los químicos precursores requeridos para la elaboración de la misma mediante el consumo, absorción o inhalación de material del hospedero ya sea en su estadio larval o adulto (Landolt & Phillips, 1997).

Al parecer, algunas especies de moscas de la fruta de la familia *Tephritidae* adquieren los precursores para sus feromonas sexuales de las plantas hospederas. Los machos adultos de *Bactrocera dorsalis* (Hendel) son atraídos por el compuesto metil-eugenol del que también se alimentan. Dicha sustancia ha sido encontrada en más de 200 plantas, muchas de las cuales son sus hospederos, así como en la feromona sexual que produce esta especie (Fitt, 1981; Nishida *et al.*, 1988). Asimismo, los machos de *B. dorsalis* que fueron alimentados con metil-eugenol fueron más competitivos

sexualmente en comparación con machos que no fueron alimentados con esta sustancia (Shelly & Dewire, 1994).

En algunos insectos fitófagos, también se ha observado el fenómeno de que el efecto de atracción de su feromona sexual se potencia al actuar en conjunto con el aroma del hospedero. Por ejemplo, el aroma producido por la combinación de la feromona de los machos de la mosca de la papaya *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker y el olor del fruto de su hospedero (*Carica papaya* L.) es más atractivo que el olor que la feromona desprende por sí sola (Landolt *et al.*, 1992). Asimismo, muchas especies del género *Drosophila* son atraídas por el aroma que resulta de la combinación de la feromona de los machos con el olor proveniente de frutos en descomposición (Bartelt *et al.*, 1986; Bartelt *et al.*, 1988). En la Mosca del Mediterráneo, *C. capitata*, la interacción de los volátiles que desprenden las hojas verdes, particularmente el compuesto trans-2-hexenal, con la feromona de los machos incrementa el grado de atracción de las hembras hacia éstos (Dickens *et al.*, 1990). La superficie de las hojas también juega un papel importante en la distribución y duración espacio-temporal de la señal emitida por la feromona sexual. Como ya se mencionó, *A. ludens* realiza deposiciones de feromona sexual en la superficie de las hojas, lo cual puede contribuir a que las hembras reciban más fácilmente la señal, ya que la tasa de evaporación de la feromona se reduce y se incrementa la amplitud de acción de la misma. Asimismo, las feromonas sexuales pueden ser absorbidas y posteriormente liberadas por las mismas hojas (Landolt & Phillips, 1997).

3.3.1. "Aromaterapia" en Moscas de la Fruta (*Tephritidae*)

Recientemente se ha visto que al exponer artificialmente en laboratorio a machos de *C. capitata* al aroma de su hospedero, éstos incrementan su competitividad sexual, método que se ha denominado "aromaterapia". Aunque no se conoce exactamente el mecanismo por el cual sucede lo anterior, se ha propuesto que la exposición de los machos a los volátiles de sus hospederos provoca cierta interacción a nivel hormonal en las feromonas de corto alcance de los machos, incrementando de esta manera su competitividad (Briceño *et al.*, 2007). Sin embargo, Shelly (2007) llevó a cabo un estudio sobre el efecto de los volátiles del hospedero en la competitividad sexual de machos de *C. capitata*. En dicho estudio se cortaron las antenas tanto de las hembras como de los machos (debido a que dichas estructuras perciben las señales químicas). En un primer ensayo, al remover las antenas de las hembras y ver a qué machos escogían entre expuestos y no expuestos, notó que no hubo diferencias significativas en el número de cópulas entre individuos tratados y no tratados. En un ensayo contrario donde cortó las antenas de los machos antes del tratamiento, la competitividad sexual de los machos expuestos aumentó significativamente en comparación con la de machos no expuestos. Lo anterior sugiere que el incremento en la competitividad sexual de los machos depende directamente de la percepción del aroma por parte de las hembras, y que los machos no requieren percibir el aroma del hospedero para lograr obtener más cópulas. Esto se traduce en que este fenómeno es más bien externo, y que el aroma, en vez de alterar procesos fisiológicos o conductuales (i.e., que los machos al detectar el aroma liberen más feromona, que la calidad de la feromona mejore, que los machos modifiquen su conducta al percibir el aroma), modifica el olor corporal de los machos al adherirse en la cutícula del

exoesqueleto, lo que los haría más atractivos hacia las hembras, debido a que explotarían el “sesgo sensorial” de éstas por ese aroma hacia los sitios de oviposición (Shelly *et al.*, 2007). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que ciertos compuestos del aceite esencial puedan servir como precursores de la feromona sexual. Se tiene documentado que algunos escarabajos de la corteza pueden absorber los precursores de su feromona sexual por vía aérea (i.e., sin necesidad de alimentarse de la planta) (Hughes, 1974; Byers, 1982), lo que en consecuencia podría sugerir que lo mismo sucede en el caso de *C. capitata*.

Aún no se ha determinado si existe un beneficio adaptativo directo de la preferencia sexual femenina hacia los machos expuestos al aroma de su hospedero. Basados en resultados obtenidos de machos de *C. capitata* expuestos al aroma del aceite esencial de raíz de jengibre, no hay evidencia de que al aparearse, éstos confirieran más beneficios directos a las hembras que los machos no expuestos, ya que la fecundidad, longevidad y puesta de huevecillos de las hembras fue similar entre hembras apareadas con ambos tipos de macho (Shelly, 2005). El posible significado de la afinidad entre el aroma corporal de los machos y el aroma de la fruta aún permanece como un misterio, pero sugiere la posibilidad de que actúe como un mecanismo de “trampa sensorial”, explotando los sesgos preexistentes de las hembras por ellos para los sitios de oviposición (West-Eberhard, 1984; Light *et al.*, 1992; Howse & Knapp, 1996; Ryan, 1998). Asimismo, podría ser que la razón por la cual prefieren copular con machos expuestos al aroma de su hospedero es porque quizás éste les puede indicar una habilidad superior para localizar árboles idóneos para el forrajeo (Shelly *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista aplicado, se ha escogido al aceite esencial como medio de exposición para los machos en vez de otros medios (e.g., plantas o

frutos), debido a que se ha visto que éste proporciona un efecto más duradero (Shelly *et al.*, 2004). Después de exponer a machos de *C. capitata* a tres tratamientos distintos: (i.e., un árbol de naranja sin frutos, hojas de naranjo y aceite esencial de naranja), se encontró que aunque la competitividad sexual de los machos se incrementó sustancialmente bajo los tres tratamientos, ésta también disminuyó con el paso del tiempo, pero en el caso del tratamiento con aceite esencial el efecto fue más duradero (cinco versus 1-2 días) (Shelly *et al.*, 2004). Lo anterior, sugiere que tratar con aceite esencial a los machos utilizados en la TIE podría incrementar su competitividad sexual durante un periodo razonable y con un método relativamente práctico y económico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar si la competitividad sexual de machos asilvestrados y estériles de *A. ludens* es favorecida después de exponerlos al aroma de los aceites esenciales (i.e., volátiles) de dos hospederos preferenciales: toronja (*C. paradisi*) o naranja (*C. aurantium*).

4.2. Objetivos Específicos

1. Comparar el número total y la duración de las cópulas obtenidas por machos asilvestrados de *A. ludens* expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de naranja agria (*C. aurantium*) o al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*).
2. Comparar el número total y la duración de las cópulas obtenidas por machos asilvestrados, expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*) vs. machos estériles, expuestos y no expuestos al aroma del mismo aceite esencial.

5. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis: La exposición de machos de *A. ludens* al aroma (i.e., aceite esencial) de sus hospederos tiene un efecto sobre su competitividad sexual.

Predicción: Las hembras elegirán copular con machos expuestos al aroma de los aceites esenciales de naranja o toronja por sobre machos que no sean sometidos a dicho tratamiento; asimismo, la cópula de los machos expuestos durará menos tiempo que la de los machos no expuestos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de la Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores (RMBPV) del Instituto de Ecología, A. C., en Xalapa, Veracruz, México. Para la realización de los experimentos se utilizaron hembras asilvestradas en fase adulta, así como machos asilvestrados y estériles en fase adulta de *A. ludens*. Un individuo asilvestrado es aquel que es mantenido en condiciones de laboratorio tanto en su fase larvaria como en su fase adulta, pero que durante la primera, se desarrolla en su hospedero natural. Asimismo, pertenece a las tres primeras generaciones desde la fundación de la colonia con individuos silvestres.

6.1. Obtención del material biológico

Los adultos asilvestrados se obtuvieron de una colonia de laboratorio fundada a partir de pupas procedentes de frutos de naranja agria (*C. aurantium*) colectados en la localidad de Miradores en el municipio de Emiliano Zapata, Veracruz entre febrero y mayo del 2008.

Para la cría de los individuos asilvestrados, los frutos infestados obtenidos en campo se distribuyeron en cestas colocadas dentro de palanganas que contenían vermiculita como sustrato de pupación [detalles en (Aluja *et al.*, 1987)]. Cada tercer día se separaron las pupas que previamente cayeron como larvas en las palanganas, para colocarlas en recipientes de plástico con vermiculita, humedeciéndolas con una solución de agua y benzoato de sodio mediante un atomizador hasta la emergencia de las moscas. Estas últimas fueron mantenidas en jaulas de plexiglás de 30 x 30 x 30 cm, alimentadas *ad libitum* con agua y alimento (sacarosa y proteína en una

proporción 3:1), en un laboratorio con condiciones ambientales controladas (temperatura: $27^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa: $70 \pm 5\%$, fotoperiodo: 12h/12h).

Al alcanzar la madurez sexual, se permitió a las hembras copular y posteriormente ovipositar en tres frutos de toronja (*C. paradisi*) de tamaño similar, los cuales fueron introducidos en las jaulas de plexiglás y cambiados cada tercer día, pasando cada uno de ellos por el proceso descrito anteriormente para la obtención de las pupas. Al momento de la emergencia, los adultos fueron separados por sexo para asegurar que los individuos utilizados en el experimento fueran vírgenes.

Los machos estériles fueron obtenidos de pupas proporcionadas por la planta MOSCAFRUT en Metapa de Domínguez, Chiapas, las cuales fueron enviadas a Xalapa dentro de recipientes de plástico de 1 L con vermiculita un día después de haber sido irradiadas a 8 krads. Al emerger, al igual que los individuos asilvestrados, los machos estériles fueron alimentados *ad libitum* con agua y alimento (sacarosa y proteína en una proporción 3:1) y separados de las hembras al momento de la emergencia para asegurar que fueran vírgenes.

6.2. Experimentos realizados

Experimento # 1: Machos asilvestrados de *A. ludens* expuestos al aroma de aceite esencial de naranja (*C. aurantium*) vs. machos asilvestrados de *A. ludens* no expuestos. Se utilizaron 20 machos adultos asilvestrados de *A. ludens* por réplica, los cuales fueron expuestos al aroma de aceite esencial de naranja agria (*C. aurantium*) y posteriormente fueron liberados en una jaula de observación junto con 20 machos adultos asilvestrados no tratados y 20 hembras adultas para observar la actividad sexual. En total se manejaron 10 réplicas.

Experimento # 2: Machos asilvestrados de *A. ludens* expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*) vs. machos asilvestrados de *A. ludens* no expuestos. Se utilizaron 20 machos adultos asilvestrados de *A. ludens* por réplica, los cuales fueron expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*) y posteriormente fueron liberados en una jaula de observación junto con 20 machos adultos asilvestrados no tratados y 20 hembras adultas para observar la actividad sexual. En total se manejaron 10 réplicas.

Experimento # 3: Machos asilvestrados y machos estériles de *A. ludens* expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*) vs. machos asilvestrados y machos estériles de *A. ludens* no expuestos. Se utilizaron 15 machos adultos asilvestrados, así como 15 machos adultos estériles irradiados a 8 Krads por réplica, los cuales fueron expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*) y posteriormente fueron liberados en una jaula de observación junto con 15 machos adultos asilvestrados y 15 machos adultos estériles no tratados, así como 15 hembras adultas asilvestradas para observar la actividad sexual. En total se manejaron 14 réplicas.

Los primeros dos experimentos se realizaron con el objetivo de comprobar si había un efecto del aroma del hospedero (naranja y/o toronja) sobre la competitividad sexual de los machos de *A. ludens*. El tercer experimento se realizó con el objetivo de comprobar si había un efecto positivo del aroma del hospedero (toronja) sobre la competitividad sexual de machos de *A. ludens* estériles puestos a competir contra machos de la misma cepa, no expuestos al aroma del aceite esencial, así como contra machos fértiles de la cepa asilvestrada (expuestos y no expuestos al aroma del aceite esencial) utilizada en los dos primeros experimentos.

6.3. Aplicación del tratamiento

Antes de la aplicación del tratamiento con los aceites esenciales, se marcaron machos experimentales y machos control por cada réplica con pinturas de agua (*Vinci*®, Grupo Dixon, México) de distintos colores en el dorso del tórax, alternando el color de marcaje en cada réplica [detalles en (Aluja *et al.*, 2001; Aluja *et al.*, 2008)]. Para la exposición al tratamiento, conforme eran marcados se colocaban manualmente por separado (experimentales y control) en el interior de un recipiente de plástico transparente de 400 ml. Posteriormente, mediante una micropipeta (*Transferpette*®, BRAND, Alemania) se aplicó el aceite esencial (*Citrus and Allied Essences Ltd.*®, Nueva York) en un papel filtro de un centímetro de diámetro. En el caso de los dos primeros experimentos se utilizaron dosis de 25 µl (con base en lo reportado por (Shelly *et al.*, 2004)] y para el tercero se aumentó la dosis a 50µl debido a que el número de machos introducidos en el recipiente fue mayor. El papel filtro fue colocado en el fondo del recipiente que contenía a los machos experimentales y se tapó la boca del recipiente con una malla de nylon. La duración del tratamiento fue de cuatro horas (17:00-21:00) y fue realizada en un cuarto aislado del resto de la colonia y de los individuos utilizados como control. Estos últimos recibieron el mismo tipo de manipulación física que los machos tratados, con la diferencia de que el papel filtro no contenía ninguna sustancia. Al finalizar el tratamiento, ambos tipos de macho (i.e., experimentales y controles) fueron retirados de sus recipientes y colocados en jaulas de plexiglás con agua y alimento *ad libitum*. Todos los individuos asilvestrados utilizados tenían entre 15 y 22 días de emergidos, mientras que los estériles tenían entre 11 y 18 días debido a que maduran sexualmente antes que los asilvestrados.

6.4. Observación de cópulas

Las observaciones de cópulas se llevaron a cabo 24 h después de que los machos habían sido expuestos al aroma de los aceites esenciales, dentro de una jaula cilíndrica de tres metros de altura por tres metros de diámetro [detalles en (Calkins & Webb, 1983)] (Fig. 2). Esta jaula se encontraba dentro de un laboratorio de simulación ambiental bajo condiciones climáticas reguladas ($27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura; $70 \pm 5\%$ de humedad relativa). Dentro de la jaula se colocaron árboles de zapote, mango y guayaba sembrados en macetas distribuidas en dos círculos concéntricos para facilitar la observación simulando un parche de vegetación [detalles en (García-Medel *et al.*, 2007)].

Para la observación de las cópulas, a las 15:00 h se liberaban dentro de la jaula tanto los machos experimentales como los controles con el propósito de dejar que en este tiempo se estableciesen los leks y, posteriormente, a las 17:00 h se liberaba a las hembras. Las observaciones se hicieron durante cuatro horas entre las 17:00 h y las 21:00 h debido a que este es el tiempo durante el cual *A. ludens* exhibe actividad sexual. Para simular el crepúsculo, los niveles de luz dentro del laboratorio fueron disminuyéndose de forma manual cada media hora. Al finalizar cada cópula, los participantes fueron extraídos mediante un vial. Se registró el tipo de macho participante en la cópula, así como la duración de la misma. Todos los individuos fueron utilizados una sola vez.



Figura 2. Jaula de observaciones dentro de laboratorio de simulación ambiental.

6.5. Análisis Estadísticos

Para determinar si en los experimentos # 1 y # 2 hubo una diferencia significativa tanto en el número de cópulas obtenidas entre machos tratados y machos control, así como su duración, los datos fueron analizados mediante una prueba de *Mann-Whitney*, debido a que la distribución de los datos no fue normal (se intentó normalizarlos pero no se pudo). Para determinar si en el experimento # 3 hubo una diferencia significativa en el número y duración de las cópulas obtenidas por machos asilvestrados o estériles, tratados o no tratados, los datos fueron analizados mediante una prueba de *Kruskal-Wallis*, debido a que la distribución de los datos no fue normal (se intentó normalizarlos pero no se pudo). Posteriormente se hizo una Prueba de Dunn como análisis *post hoc* para ver diferencias individuales entre tratamientos (Dunn, 1964; Siegel & Castellan, 1988; Zar, 1999). Todos los datos se reportan como mediana (rango intercuartil). Todos los análisis se hicieron con el programa de cómputo STATISTICA (versión 8.0).

7. RESULTADOS

Experimento # 1: Machos asilvestrados de *A. ludens* expuestos al aroma de aceite esencial de naranja (*C. aurantium*) vs. machos asilvestrados de *A. ludens* no expuestos. No hubo una diferencia significativa en el número de cópulas obtenidas entre los machos tratados con aceite esencial de naranja [8.5 (8 - 10)] y los machos control [8 (6 - 9)] (*Mann-Whitney*: $U= 33.5$, $p= 0.217$) (Fig. 3A). Tampoco hubo diferencias significativas en la duración de la cópula. Mientras que los individuos expuestos al aroma del aceite esencial copularon 53.1 (50 - 61) minutos, los individuos control copularon 52.7 (47.2 - 61.9) minutos (*Mann-Whitney*: $U= 46$, $p= 0.79$) (Fig. 3B).

Experimento # 2: Machos asilvestrados de *A. ludens* expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*) vs. machos asilvestrados de *A. ludens* no expuestos. Los machos tratados con aceite esencial de toronja obtuvieron un número significativamente mayor de cópulas [9 (8 - 9)] que los machos control [7 (6 - 8)] (*Mann-Whitney*: $U= 18$, $p= 0.01$) (Fig. 4A). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la duración de las cópulas. Los individuos expuestos al aroma del aceite esencial copularon 52.8 (50 - 61.4) minutos, mientras que los individuos utilizados como control copularon 57.4 (48.8 - 66) minutos (*Mann-Whitney*: $U= 45$, $p= 0.73$) (Fig. 4B).

Experimento # 3: Machos asilvestrados y machos estériles de *A. ludens* expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*) vs. machos asilvestrados y machos estériles de *A. ludens* no expuestos. Hubo diferencias significativas en el número de cópulas obtenidas entre ambos tipos de machos (*Kruskal-Wallis*: $H= 29.77$, $p < 0.005$) (Fig. 5A). Los machos asilvestrados obtuvieron un número significativamente mayor de cópulas [Expuestos y No Expuestos: 3 (2 - 4)] que los

machos estériles [Expuestos y No Expuestos: 0.5 (0 - 1)], independientemente de si fueron o no expuestos al aroma; sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los machos expuestos al tratamiento y los machos no expuestos dentro de cada tipo de macho (Cuadro 1). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la duración de la cópula. Los individuos asilvestrados expuestos al aroma del aceite esencial copularon 62.5 (49.3 - 111.5) minutos, los machos asilvestrados control copularon 61.1 (44.3 - 76.5) minutos, los individuos estériles expuestos copularon 72 (35 - 84) minutos y por último, los machos estériles control copularon 72 (47.5 - 116) minutos (*Kruskal-Wallis*: $H= 1.14$, $p= 0.76$) (Fig. 5B).

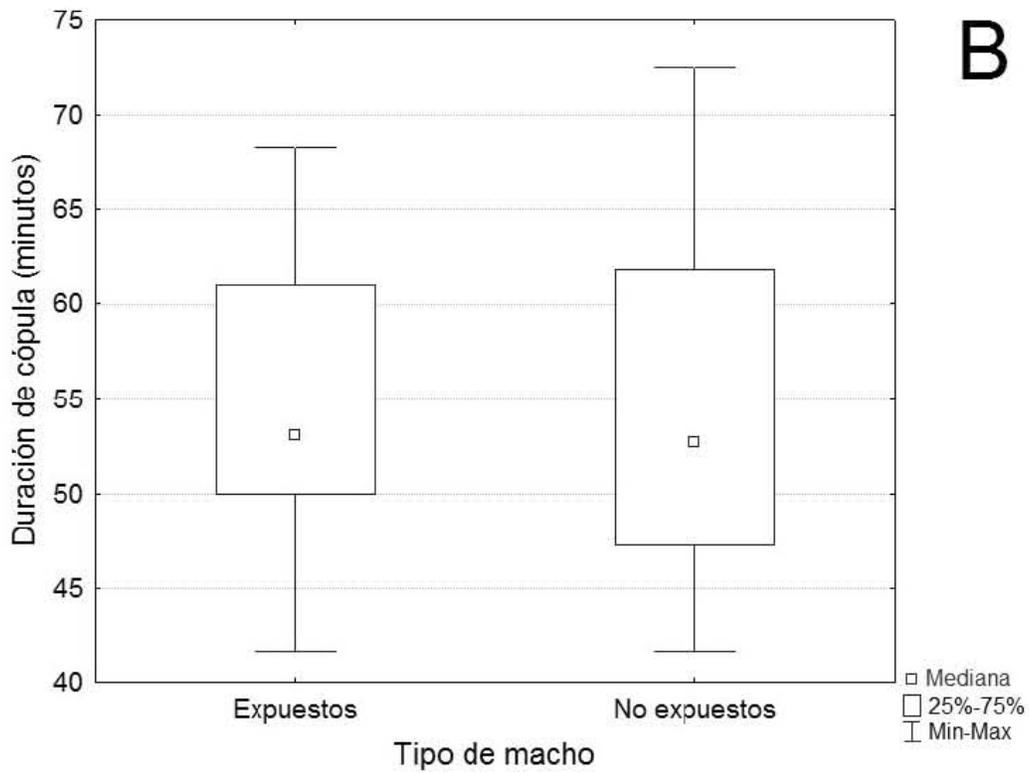
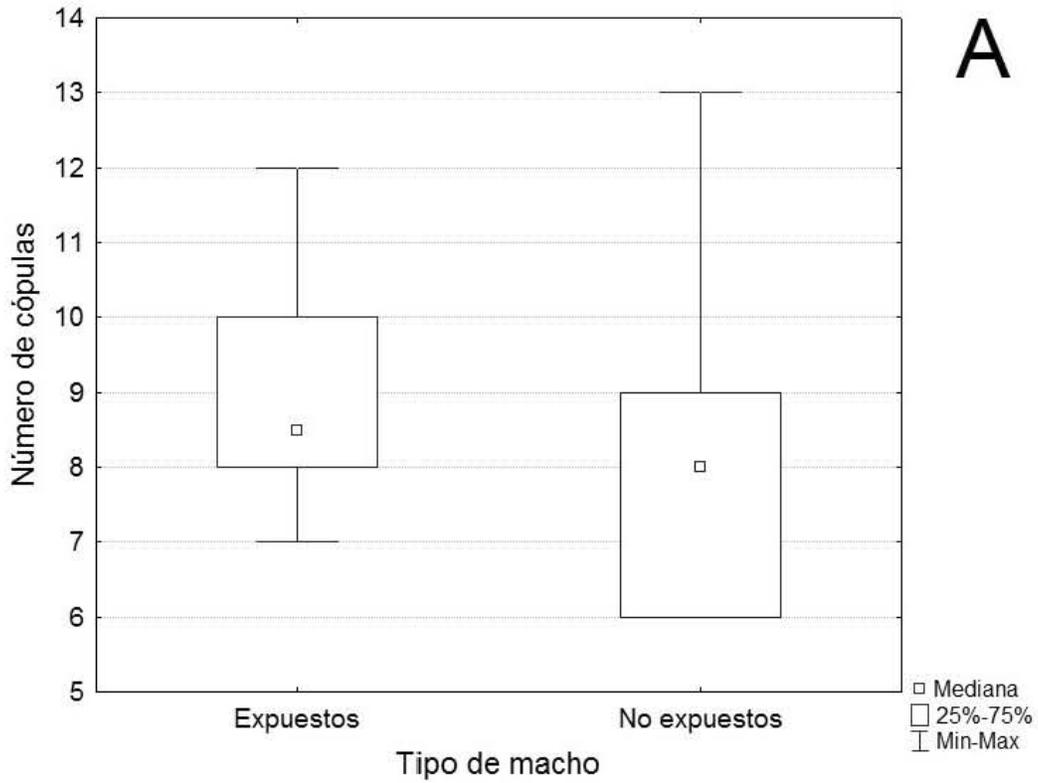


Figura 3. Número (A) y duración (B) de cópulas obtenidas por machos asilvestrados de *A. ludeus* expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de naranja (*C. aurantium*).

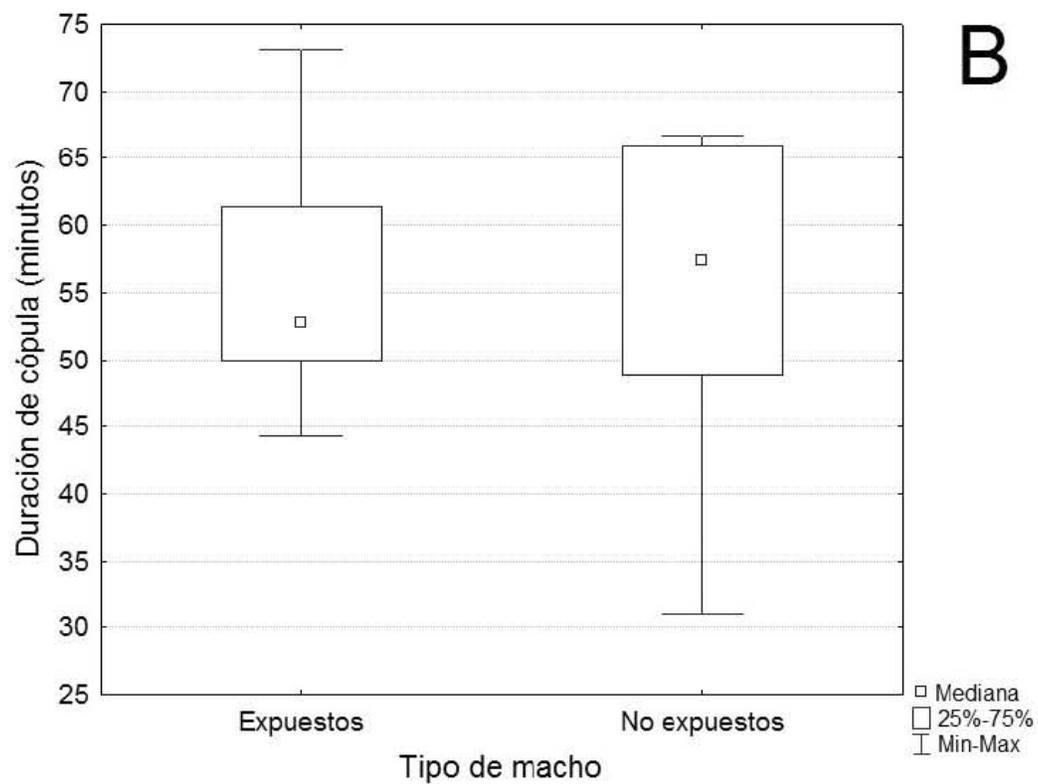
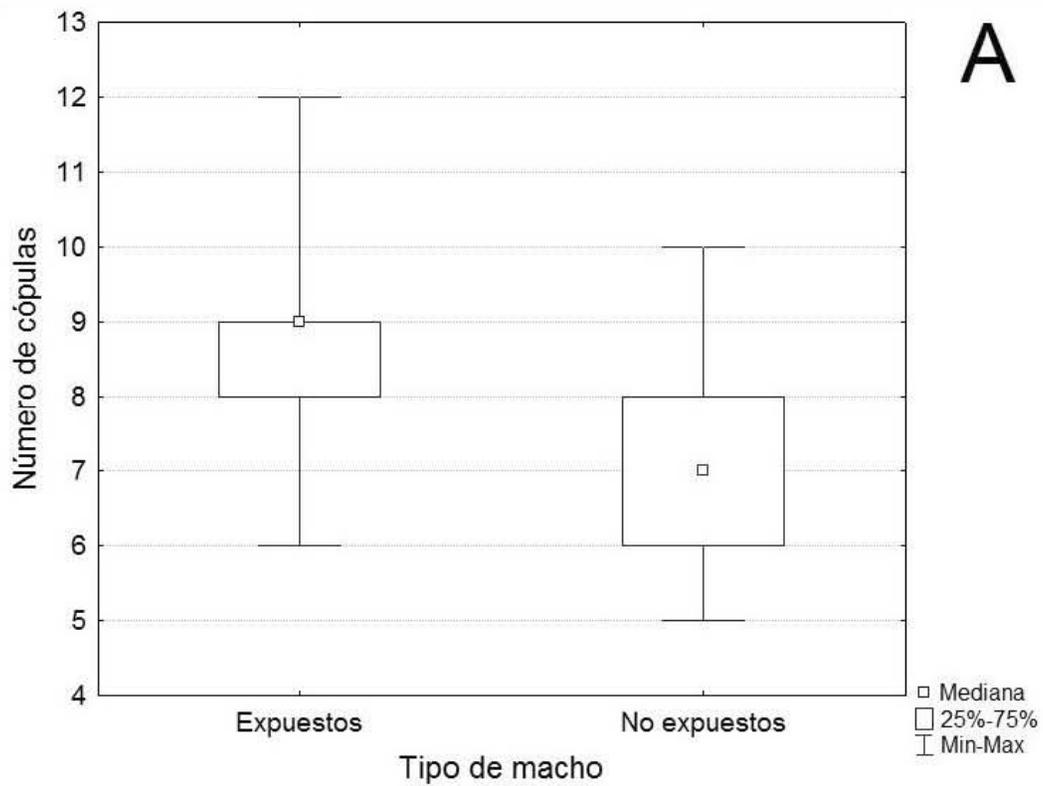


Figura 4. Número (A) y duración (B) de cópulas obtenidas por machos asilvestrados de *A. ludens* expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*).

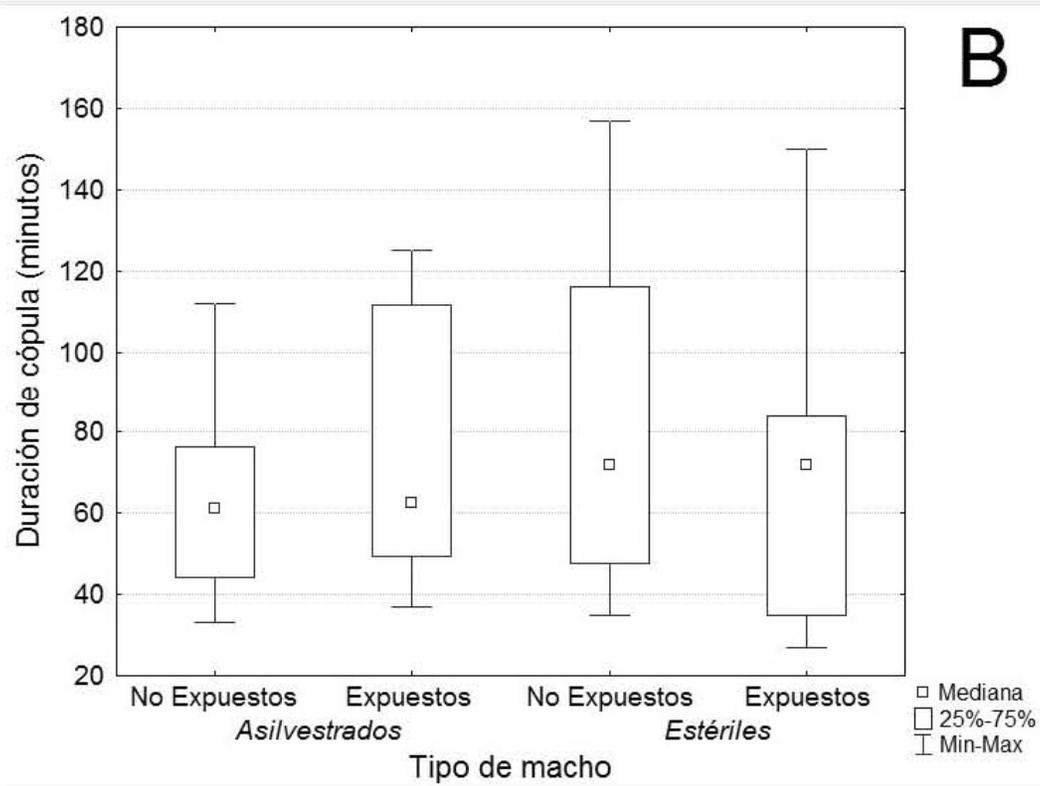
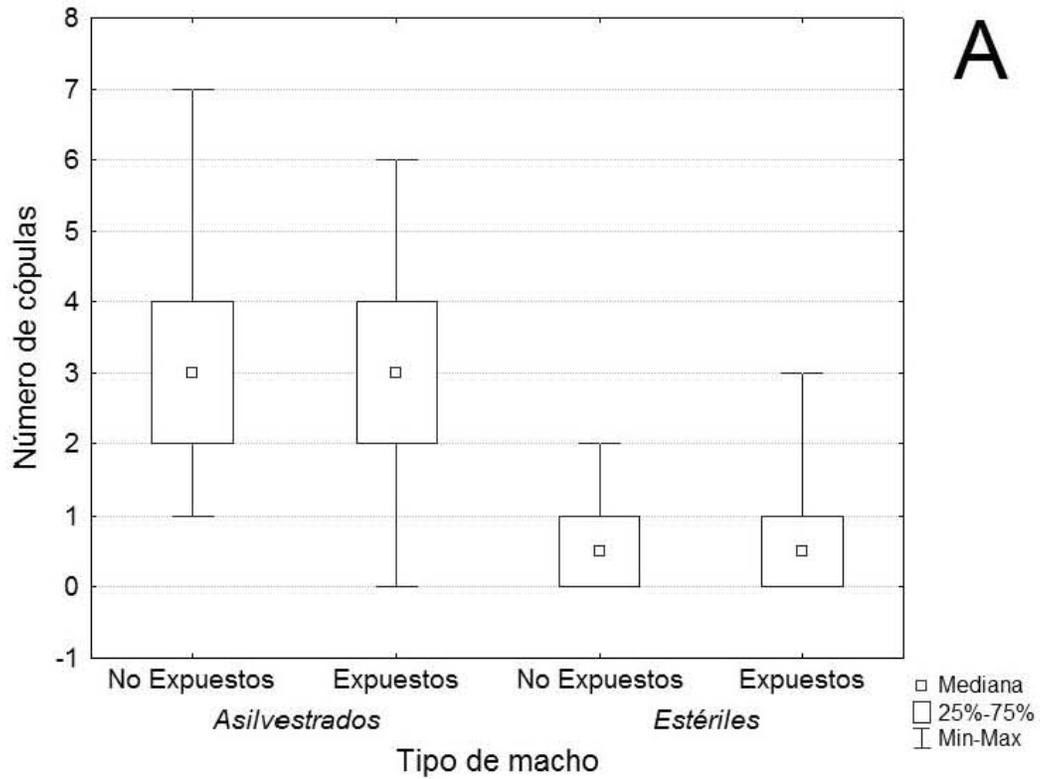


Figura 5. Número (A) y duración (B) de cópulas obtenidas por machos asilvestrados y estériles de *A. ludens* expuestos y no expuestos al aroma de aceite esencial de toronja (*C. paradisi*).

Cuadro 1. Prueba de Dunn de comparaciones múltiples del número de cópulas obtenidas por machos de *A. ludens* asilvestrados e irradiados, expuestos y no expuestos al aceite esencial de toronja (*C. paradisi*). Valores de *p* menores que 0.05 indican diferencias significativas entre tratamientos.

Tratamiento	Asilvestrados	Asilvestrados	Estériles	Estériles
	No Expuestos	Expuestos	No Expuestos	Expuestos
Asilvestrados No Expuestos		1.000	<0.001	<0.001
Asilvestrados Expuestos	1.000		<0.005	<0.005
Estériles No Expuestos	<0.001	<0.005		1.000
Estériles Expuestos	<0.001	<0.005	1.000	

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el aroma de la toronja (i.e., aceites esenciales de ese fruto), aumentó la competitividad sexual de machos asilvestrados de la Mosca Mexicana de la Fruta (*A. ludens*), aunque a diferencia de lo observado en la Mosca del Mediterráneo (*C. capitata*) el efecto no es tan drástico y, como se explicará más adelante, seguramente no se trata de un efecto *per se* como sucede en esta última especie. El número de cópulas obtenidas por los individuos expuestos al aroma del aceite esencial de toronja fue significativamente mayor en comparación con los individuos asilvestrados no expuestos, aunque cabe señalar que esta diferencia no fue contundente (i.e., 56% vs. 44% de cópulas). Aunado a lo anterior, el efecto sólo se dio en machos expuestos al aroma de este aceite esencial y no con el de naranja, y en el caso de los primeros, sólo cuando fue en competencia directa entre individuos asilvestrados expuestos y no expuestos (experimento #1). Cuando los machos compitieron con congéneres irradiados, expuestos y no expuestos al aroma del aceite esencial de toronja (experimento #3), el efecto observado en el experimento #1 se diluyó. Por esta razón y las que se expondrán a continuación, sería pertinente realizar más estudios para poder afirmar de manera categórica si sería útil aplicarlo o no en el programa de la TIE dentro de la Campaña Nacional contra las Moscas de la Fruta en México.

Para poder explicar porqué si existió un efecto con el aceite esencial de toronja y no con el de naranja, conviene recordar que los adultos asilvestrados (machos y hembras) utilizados en este estudio provenían de larvas desarrolladas en frutos de toronja. Algunos estudios han sugerido que la experiencia de las larvas de insectos fitófagos dentro del hospedero influencia el comportamiento (e.g., alimentación, oviposición) durante la etapa adulta, incrementando la preferencia por esa planta como

hospedero. Lo anterior fue llamado "condicionamiento preimaginario" (Thorpe & Jones, 1937). Aunque esto no se ha comprobado para el comportamiento sexual, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el medio de desarrollo larvario podría influir en el desempeño sexual del adulto. Pérez-Staples et al. (2008), encontraron que la duración de la cópula de los machos de *A. ludens* variaba dependiendo del medio de desarrollo larvario y de la dieta a la que eran sometidos posteriormente cuando adultos. Asimismo, basados en las enormes diferencias en el éxito de apareamiento de los machos de *C. capitata* alimentados con distintos hospederos, se ha sugerido que el medio de desarrollo larvario (i.e., fruto hospedero) puede afectar la composición de la feromona sexual del adulto (Arita & Kaneshiro, 1988). Sin embargo, aunque el condicionamiento preimaginario puede expresarse siempre y cuando se sigan ciertas formas de condicionamiento, la evidencia indica que la experiencia durante la etapa adulta tiene una mayor influencia sobre los patrones de reconocimiento y uso del hospedero en los insectos fitófagos. Lo anterior se debe principalmente a que en los insectos holometábolos, la reorganización del sistema nervioso durante la metamorfosis es tan drástica que es bastante difícil concebir que la memoria quimio-sensorial con base en conexiones neurales pueda subsistir en la etapa adulta (Barron, 2001).

Algunos insectos pueden ser especialmente sensibles a las experiencias tempranas que experimentan recién emergidos del pupario. Se ha visto que el comportamiento de los individuos adultos, más que por condicionamiento preimaginario, puede ser influenciado por una "impronta" con el medio de desarrollo larvario contenido en el pupario (Corbet, 1985). Por ejemplo, en *Drosophila*, trazas de la dieta larvaria en la superficie del pupario son suficientes para inducir un cambio en las respuestas de los adultos emergidos de ese pupario hacia ese hospedero (Barron & Corbet, 1999). Estas trazas de dieta pueden encontrarse dentro del pupario, así como en su superficie

(Corbet, 1985). Aunado a lo anterior, se sabe que tanto los estímulos visuales como químicos del fruto hospedero son importantes en la atracción innata y aprendida de las moscas de la fruta hacia él (Papaj & Prokopy, 1986; Fletcher & Prokopy, 1991; Henneman & Papaj, 1999; Robacker & Fraser, 2005). Hembras adultas de *A. ludens* que fueron expuestas a cáscara de toronja y a la pulpa de la misma, desarrollaron atracción hacia este fruto (Robacker & Fraser, 2005). Lo anterior indicaría que las moscas no buscan el fruto hospedero instintivamente, sino que aprenden el aroma de la fruta durante el forrajeo y con base en ello buscan ese mismo fruto para ovipositar. Asimismo, la exposición a un hospedero específico, incrementó la atracción hacia ese hospedero en particular por sobre otros (Robacker & Fraser, 2005), lo que revela que no solamente pueden aprender el aroma del hospedero sino que pueden distinguir entre varios aromas después de experimentar con uno de ellos.

Todo lo anterior podría sugerir una explicación de por qué la exposición al aceite esencial de toronja funcionó y el de naranja no. Si las hembras utilizadas en este trabajo tuvieron contacto con trazas de toronja al emerger del pupario, sería lógico pensar que estaban sesgadas hacia el aroma de ese fruto, y entonces el aroma corporal de los machos jugaría un papel importante en el éxito para obtener la cópula al aprovechar ese "sesgo sensorial" presente en las hembras hacia el aroma de toronja. Como se mencionó, algunos de los estudios de "aromaterapia" que se han realizado, han demostrado que la exposición de los machos al aroma del hospedero no afecta la atractividad de su feromona sexual en sí (Shelly, 2001; Papadopoulos et al., 2006; Shelly et al., 2007), sino que el efecto se da porque los volátiles se impregnan en el exoesqueleto de los insectos, produciendo un aroma atractivo hacia las hembras (Shelly et al., 2007). Esto nos indica que en *A. ludens*, no se da un efecto *per se* como sucede en

la Mosca del Mediterráneo (*C. capitata*), sino que más bien este probablemente existió debido al condicionamiento previo que las hembras tuvieron hacia el aroma de toronja.

Otra posible explicación para el incremento en la competitividad sexual de los machos expuestos al aceite esencial de toronja, es que éstos hicieran mayor número de "llamados" (i.e., secreción y deposición de feromona en las hojas, así como aleteos para dispersarla) a las hembras. Si bien, lo anterior no fue medido en esta investigación, en estudios previos se ha visto que existe una relación directa entre la actividad de llamado de los machos y su éxito para conseguir una pareja (Sivinski et al., 1994; Whittier et al., 1994; Aluja et al., 2001). Asimismo, en un estudio con *C. capitata*, los machos expuestos a aceite esencial de jengibre invirtieron más tiempo en el "llamado" a hembras que los machos no expuestos (Shelly, 2001). Sería adecuado efectuar estudios más detallados para ver si la exposición al aroma del hospedero interviene en este comportamiento en *A. ludens*.

Respecto a la dilución del efecto del aceite esencial de toronja en el experimento #3 donde el número de cópulas obtenidas entre machos asilvestrados o estériles, expuestos y no expuestos, fue similar, puede atribuirse a la proporción de machos por hembra en la jaula. Mientras en el experimento # 2, la relación macho-hembra era de 2:1, en el experimento # 3, la relación era de 4:1. Lo anterior pudo provocar que el comportamiento sexual de los machos se alterara, dirigiendo el cortejo hacia otros machos al no haber tantas hembras disponibles, lo cual coincidiría con observaciones hechas en estudios previos (Gaskin et al., 2002; Diaz-Fleischer & Aluja, 2003; Diaz-Fleischer et al., 2009) o bien, que al haber más machos estos compitieran en mayor medida entre sí, lo cual diluiría la ventaja que los expuestos obtuvieron sobre los no expuestos en el experimento # 2. Lo anterior también podría explicar el número de

cópulas en promedio que se obtuvieron en el experimento # 3, que fueron menos de la mitad de las obtenidas en los experimentos # 1 y # 2.

En lo que respecta a la duración de las cópulas, aunque no hubo diferencias entre individuos expuestos y no expuestos al aroma de los aceites esenciales en ninguno de los tres experimentos (lo que indicaría que este parámetro no se ve influenciado por el aroma de los machos), se puede observar un fenómeno interesante: mientras que en los experimentos # 1 y # 2 la mediana de las mismas fue de alrededor 54 minutos, en el experimento # 3, la mediana se incrementó a alrededor de 67 minutos. Aunque no era nuestro objetivo comparar la duración debido a la densidad de machos, es claro que esto último afectó este parámetro. Al haber mayor cantidad de machos en la jaula en el experimento # 3 que en los otros dos experimentos, éstos tenderían a copular más tiempo ya que mediante una cópula de mayor duración, se evitaría la competencia espermática, tal y como sugiere Parker (1970).

Basados en la clara evidencia reportada en la literatura especializada (Cayol, 2000; Toledo *et al.*, 2004; Rull *et al.*, 2007), es obvio que las diferencias significativas en el número de cópulas obtenidas entre machos de distintos orígenes (i.e., asilvestrados y estériles) se deben a la mala calidad de estos últimos, la cual es derivada de las condiciones de cría masiva y la radiación a la que son sometidos al esterilizarlos, que les impide ser competitivos frente a los machos silvestres. A pesar de la evidencia que existe de los efectos negativos de la cría masiva y de las altas dosis de radiación, los encargados de los programas de la TIE continúan produciendo y liberando grandes cantidades de insectos obtenidos de colonias de laboratorio muy viejas e irradiándolos a dosis altas. Existe poca información publicada acerca de la dosis de radiación ideal para *A. ludens* (Rhode *et al.*, 1961; Rull *et al.*, 2007), y no existe evidencia alguna que justifique utilizar 8 krads para inducir esterilidad completa en estas moscas. Por el

contrario, está bien documentado que los individuos esterilizados a dosis bajas tienen mayor éxito que individuos irradiados a dosis altas para copular con hembras silvestres y aún así inducir a que las hembras pongan huevecillos no fertilizados (Cayol, 2000; Lux *et al.*, 2002).

Tomando en cuenta todo lo mencionado hasta ahora, se considera que es indispensable atender los siguientes aspectos para futuras investigaciones:

1. Llevar a cabo estudios para determinar si la competitividad sexual de machos las moscas de la fruta se incrementa debido a que el hospedero en el cual se desarrollaron como larvas los estimula para liberar su feromona a una tasa mayor a la común, si su feromona es más atractiva en presencia del aroma del mismo, o bien, si este aroma es utilizado por los machos como forma de atraer hembras al adherirse las moléculas de los aceites esenciales en su cutícula y difundirse de manera gradual a lo largo del tiempo.
2. Realizar estudios exponiendo también a las hembras de *A. ludens* a los aceites esenciales. Como se mencionó, el efecto observado en el caso del aceite esencial de toronja pudo deberse a la experiencia de las hembras con el aroma de este fruto al emerger del pupario. Si se expone tanto a las hembras como a los machos al aroma del aceite esencial y se obtiene que hay mayor cantidad de cópulas con los machos expuestos, se podría comprobar que en los adultos de *A. ludens* la experiencia previa de las hembras con el aroma del hospedero, así como juega un papel importante para reconocer al mismo, también lo haría para reconocer una potencial pareja.
3. Asimismo, sería ideal que los agentes encargados de dirigir los programas de control de *A. ludens* que involucran la TIE, modificaran la dosis de radiación a la que son sometidos los individuos para esterilizarlos, así como mejorar las

condiciones en las que son criados, ya que como se constató en esta investigación, la competitividad sexual de estos últimos al enfrentarse contra individuos asilvestrados, fue muy inferior. Esta situación seguramente se exacerbará bajo condiciones 100% naturales, lo cual amerita, al menos en mi opinión, un análisis a fondo sobre el tema.

9. CONCLUSIONES

Aunque en esta investigación se observó un efecto positivo sobre la competitividad sexual de los machos asilvestrados de *A. ludens* expuestos al aroma del aceite esencial de toronja, dicho efecto puede ser un tanto “engañoso”. El efecto pudo haber sido resultado de que las hembras tuvieron experiencia con el aroma de la toronja al emerger del pupario, es decir, pudo ser causado por un condicionamiento previo de éstas, más que por un efecto *per se* como se ha visto que ocurre en la Mosca del Mediterráneo *C. capitata* cuando los adultos son expuestos al aceite esencial de raíz de jengibre (Shelly *et al.*, 2002; Shelly *et al.*, 2004; Shelly *et al.*, 2007).

Asimismo, se encontró que el efecto del aceite esencial de toronja sobre la competitividad sexual de los machos en los individuos asilvestrados se diluyó al introducir machos estériles en el ensayo y que éstos tampoco se vieron favorecidos por el tratamiento. Esto sugiere que el efecto tampoco es tan contundente y que al haber diferentes proporciones macho: hembra, como podría ocurrir en el campo, no sería pertinente aplicarlo como complemento de la TIE dentro de la Campaña Nacional contra las Moscas de la Fruta.

Aunado a lo anterior, en este trabajo, se observó que la diferencia entre el número de cópulas obtenidas por machos de distintos orígenes (i.e., asilvestrados y estériles) fue altamente significativa a favor de los asilvestrados, lo cual coincide con lo reportado previamente en la literatura. Ello indica que es necesario que se tomen medidas urgentes para mejorar las condiciones en que son criados masivamente los machos estériles, lo que incluye reducir la dosis de irradiación con la que son esterilizados, ya que su competitividad sexual está muy por debajo de la de los machos asilvestrados.

Por último, se sugiere que es necesario también, realizar más ensayos de comportamiento sexual involucrando la exposición al hospedero, al considerar que dicho factor es crítico para comprender mejor los mecanismos por los cuáles ocurre la atracción de pareja en los insectos fitófagos, como lo son las moscas de la fruta (*Tephritidae*).

10. LITERATURA CITADA

- Aluja, M. (1993). *Manejo Integrado de la Mosca de la Fruta*. México, D.F. Ed. Trillas.
- Aluja, M. (1994). Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology* 39: 155-178.
- Aluja, M. & A. Birke (1993). Habitat use by adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a mixed mango and tropical plum orchard. *Annals of the Entomological Society of America* 86: 799-812.
- Aluja, M., M. Cabrera, H. Celedonio, P. Liedo & J. Hendrichs (1987). Natural host plant survey of the economically important fruit flies (Diptera: Tephritidae) of Chiapas, Mexico. *Florida Entomologist* 70: 329-338.
- Aluja, M., J. Hendrichs & M. Cabrera (1983). Behavior and interactions between *Anastrepha ludens* (L.) and *A. obliqua* (M.) on a field caged mango tree. I. Lekking behavior and male territoriality. En: *Fruit Flies of Economic Importance. Proc. CEC/IOBC Symp.*, Athens, Greece / Balkema, Rotterdam.
- Aluja, M., I. Jácome & R. Macías-Ordóñez (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.
- Aluja, M. & R. L. Mangan (2008). Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual and methodological considerations. *Annual Review of Entomology* 53: 449-472.
- Aluja, M., D. Pérez-Staples, J. Sivinski, A. Sánchez & J. Pinero (2008). Effects of male condition on fitness in two tropical tephritid flies with contrasting life histories. *Animal Behaviour* 76: 1997-2009.
- Aluja, M., J. Piñero, I. Jácome, F. Díaz-Fleischer & J. Sivinski (2000). Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). En: M. Aluja & A. L. Norrbom (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. Boca Raton, Florida, USA. Ed. CRC Press.
- Aluja, M., J. Rull, D. Pérez-Staples, F. Díaz-Fleischer & J. Sivinski (2009). Random mating among *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults of geographically distant and ecologically distinct populations in Mexico. *Bulletin of Entomological Research* 99: 207-214.
- Andersson, M. & Y. Iwasa (1996). Sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 53-58.
- Arita, L. H. & K. Y. Kaneshiro (1988). Body size and differential mating success between males of two populations of the Mediterranean fruit fly. *Pacific Science* 42: 173-177.
- Baker, R., R. H. Herbert & G. G. Grant (1985). Isolation and identification of the sex pheromone of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wied). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* 1985: 824-825.
- Baker, T. C. (1989). Origin of courtship and sex pheromones of the Oriental fruit moth and a discussion of the role of phytochemicals in the evolution of lepidopteran male scents. En: C.-H.

Chou & G. R. Waller (Eds.), *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones*. Taipei. Ed. Academia Sinica.

Bakri, A., N. Heather, J. Hendrichs & I. Ferris (2005). Fifty years of radiation biology in entomology: Lessons learned from IDIDAS. *Annals of the Entomological Society of America* **98**: 1-12.

Barron, A. B. (2001). The life and death of Hopkins' host-selection principle. *Journal of Insect Behavior* **14**: 725-737.

Barron, A. B. & S. A. Corbet (1999). Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. *Animal Behaviour* **58**: 621-628.

Bartelt, R. J., A. M. Schaner & L. L. Jackson (1986). Aggregation pheromones in five taxa of the *Drosophila virilis* species group. *Physiological Entomology* **11**: 367-376.

Bartelt, R. J., A. M. Schaner & L. L. Jackson (1988). Aggregation pheromones in *Drosophila borealis* and *Drosophila littoralis*. *Journal of Chemical Ecology* **14**: 1319-1327.

Birke, A., M. Aluja, P. Greany, E. Bigurra, D. Pérez-Staples & R. McDonald (2006). Long aculeus and behavior of *Anastrepha ludens* render gibberellic acid ineffective as an agent to reduce 'Ruby Red' grapefruit susceptibility to the attack of this pestiferous fruit fly in commercial groves. *Journal of Economic Entomology* **99**: 1184-1193.

Boake, C. R. B., T. E. Shelly & K. Y. Kaneshiro (1996). Sexual selection in relation to pest-management strategies. *Annual Review of Entomology* **41**: 211-229.

Bradbury, J. W. (1981). The evolution of leks. En: R. D. Alexander & D. W. Tinkle (Eds.), *Natural selection and social behavior*. New York. Ed. Chiron Press.

Briceño, D., W. Eberhard & T. Shelly (2007). Male courtship behavior in *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) that have received aromatherapy with ginger root oil. *Florida Entomologist* **90**: 175-179.

Burk, T. (1983). Behavioral ecology of mating in the Caribbean Fruit Fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* **66**: 330-344.

Byers, J. A. (1982). Male-specific conversion of the host plant compound, myrcene, to the pheromone, (+)-ipsdienol, in the bark beetle, *Dendroctonus brevicornis*. *Journal of Chemical Ecology* **8**: 363-371.

Calkins, C. O. & T. R. Ashley (1989). The impact of poor quality of mass-reared Mediterranean fruit flies on the sterile insect technique used for eradication. *Journal of Applied Entomology* **108**: 401-408.

Calkins, C. O. & J. C. Webb (1983). A cage and support framework for behavioral tests of fruit flies in the field. *Florida Entomologist* **66**: 512-514.

Cayol, J. P. (2000). Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by mass-rearing processes. En: M. Aluja & A. L. Norrbom (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. Boca Raton, Florida, USA. Ed. CRC Press.

- Clutton-Brock, T. H. (1988). *Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems*. London, England. Ed. University of Chicago Press.
- Corbet, S. A. (1985). Insect chemosensory responses: A chemical legacy hypothesis. *Ecological Entomology* 10: 143-153.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London, England. Ed. J. Murray.
- Darwin, C. (1871). *The Descent of Man and Selection in Relation to Sex*. New York, USA. Ed. Modern Library.
- Diaz-Fleischer, F. & M. Aluja (2003). Behavioural plasticity in relation to egg and time limitation: the case of two fly species in the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Oikos* 100: 125.
- Diaz-Fleischer, F., J. Arredondo & M. Aluja (2009). Enriching early adult environment affects the copulation behaviour of a tephritid fly. *Journal of Experimental Biology* 212: 2120.
- Dickens, J. C., E. B. Jang, D. M. Light & A. R. Alford (1990). Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. *Naturwissenschaften* 77: 29-31.
- Dukas, R. & A. Mooers (2003). Environmental enrichment improves mating success in fruit flies. *Animal Behaviour* 66: 741-749.
- Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* 6: 241-252.
- Dyck, V. A., J. Hendrichs & A. S. Robinson (2005). *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-wide Integrated Pest Management*. Dordrecht, Netherlands. Ed. Springer.
- Epsky, N. D. & R. R. Heath (1993). Food availability and pheromone production by males of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 22: 942-947.
- FAO/IAEA/USDA (2003). Manual for Product Quality Control and Shipping Procedures for Sterile Mass-Reared Tephritid Fruit Flies. Version 5.0. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. 85 pp.
- Field, S. A., P. W. Taylor & B. Yuval (1999). Sources of variability in copula duration of Mediterranean fruit flies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92: 271-276.
- Fitt, G. P. (1981). Responses by female Dacinae to "male" lures and their relationship to patterns of mating behaviour and pheromone response. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 29: 87-97.
- Fletcher, B. S. & R. J. Prokopy (1991). Host location and oviposition in tephritid fruit flies. En: J. Bailey & J. Ridsdill-Smith (Eds.), *Reproductive Behaviour of Insects. Individuals and Populations*. London. Ed. Chapman & Hall.
- Garcia-Medel, D., J. Sivinski, F. Diaz-Fleischer, R. Ramirez-Romero & M. Aluja (2007). Foraging behavior by six fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) released as single-or multiple-species cohorts in field cages: Influence of fruit location and host density. *Biological Control* 43: 12-22.

Gaskin, T., P. Futerman & T. Chapman (2002). Increased density and male-male interactions reduce male longevity in the medfly, *Ceratitis capitata*. *Animal Behaviour* 63: 121-129.

Hendrichs, J., A. S. Robinson, J. P. Cayol & W. Enkerlin (2002). Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. *Florida Entomologist* 85: 1-13.

Henneman, M. L. & D. R. Papaj (1999). Role of host fruit color in the behavior of the walnut fly *Rhagoletis juglandis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 93: 247-256.

Hernández-Ortiz, V. & M. Aluja (1993). Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. *Folia Entomológica Mexicana*. 33: 88-105.

Hine, E., S. Lachish, M. Higgie & M. W. Blows (2002). Positive genetic correlation between female preference and offspring fitness. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 269: 2215.

Hirsch, H. V. & L. Tompkins (1994). The flexible fly: experience-dependent development of complex behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* 195: 1-18.

Höglund, J. & R. V. Alatalo (1995). *Leks*. Princeton, NJ. Ed. Princeton University Press.

Howse, P. E. & J. J. Knapp (1996). Pheromones of Mediterranean Fruit Fly: presumed mode of action and implications for improved trapping techniques. En: B. A. McPheron & G. J. Steck (Eds.), *Fruit Fly Pests: A World Assessment of their Biology and Management*. Delray Beach, Florida, USA. Ed. St. Lucie Press.

Hughes, P. R. (1974). Myrcene: a precursor of pheromones in *Ips* beetles. *Journal of Insect Physiology* 20: 1274.

Johansson, B. G. & T. M. Jones (2007). The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews* 82: 265-289.

Jones, T. M. & J. G. C. Hamilton (1998). A role for pheromones in mate choice in a lekking sandfly. *Animal Behaviour* 56: 891-898.

Jones, T. M., R. J. Quinnell & A. Balmford (1998). Fisherian flies: benefits of female choice in a lekking sandfly. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 265: 1651.

Kim, Y. K., L. Ehrman & H. R. Koepfer (1992). Developmental isolation and subsequent adult behavior of *Drosophila paulistorum*. *Behavior Genetics* 22: 545-556.

Knoppien, P. (1987). Rare-male mating advantage: an artifact caused by differential storage conditions? *Behavior genetics* 17: 409-425.

Krebs, J. R. & R. Dawkins (1984). Animal signals: mind-reading and manipulation. *Behavioural ecology: an evolutionary approach* 2: 380-402.

Landolt, P. J. (1997). Sex attractant and aggregation pheromones of male phytophagous insects. *American Entomologist* 43: 12-22.

Landolt, P. J., R. R. Heath, J. G. Millar, K. M. Davis-Hernandez, B. D. Dueben & K. E. Ward (1994). Effects of host plant, *Gossypium hirsutum* L., on sexual attraction of cabbage looper moths, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Chemical Ecology* 20: 2959-2974.

Landolt, P. J. & T. W. Phillips (1997). Host plant influences on sex pheromone behavior of phytophagous insects. *Annual Review of Entomology* 42: 371-391.

Landolt, P. J., H. C. Reed & R. R. Heath (1992). Attraction of female Papaya Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to male pheromone and host fruit. *Environmental Entomology* 21: 1154-1159.

Light, D. M., E. B. Jang & R. A. Flath (1992). Electroantennogram responses of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, to the volatile constituents of nectarines. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 63: 13-26.

Lux, S. A., J. C. Vilardi, P. Liedo, K. Gaggi, G. E. Calcagno, F. N. Munyiri, M. T. Vera & F. Manso (2002). Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera: Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomologist* 85: 102-112.

Malavasi, A., J. S. Morgante & R. J. Prokopy (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.

McInnis, D. O., T. E. Shelly & J. Komatsu (2002). Improving male mating competitiveness and survival in the field for medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) SIT programs. *Genetica* 116: 117-124.

McInnis, D. O., T. E. Shelly & R. F. Mau (2006). All male strains and chemical stimulants: two ways to boost sterile males in SIT programs. En: *Proceedings of International Symposium on Area-wide Management of Insect Pests*, Naha, Okinawa, Japan.

Moore, A. J. (1994). Genetic evidence for the "good genes" process of sexual selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 35: 235-241.

Moore, A. J. & M. D. Breed (1986). Mate assessment in a cockroach, *Nauphoeta cinerea*. *Animal Behaviour* 34: 1160-1165.

Nation, J. L. (1989). The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies. En: *World Crop Pests, Fruit Flies: their Biology, Natural Enemies and Control*. Ed. Elsevier. Amsterdam, Netherlands.

Nishida, R., K. H. Tan, M. Serit, N. H. Lajis, A. M. Sukari, S. Takahashi & H. Fukami (1988). Accumulation of phenylpropanoids in the rectal glands of males of the Oriental fruit fly, *Dacus dorsalis*. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 44: 534-536.

Orozco-Dávila, D., R. Hernández, S. Meza & J. Domínguez (2007). Sexual competitiveness and compatibility between mass-reared sterile flies and wild populations of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) from different regions in Mexico. *Florida Entomologist* 90: 19-26.

Papadopoulos, N. T., T. E. Shelly, N. Niyazi & E. Jang (2006). Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil

and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior* 19: 403-418.

Papaj, D. R. & R. J. Prokopy (1986). Phytochemical basis of learning in *Rhagoletis pomonella* and other herbivorous insects. *Journal of Chemical Ecology* 12: 1125-1143.

Parker, G. A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Cambridge Philosophical Society Biology Reviews* 45: 525-567.

Penn, D. J. (2002). The scent of genetic compatibility: sexual selection and the major histocompatibility complex. *Ethology* 108: 1-21.

Perez-Staples, D., M. Aluja, R. Macías-Ordóñez & J. Sivinski (2008). Reproductive trade-offs from mating with a successful male: the case of the tephritid fly *Anastrepha obliqua*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 1333-1340.

Phelan, P. L. (1992). Evolution of sex pheromones and the role of asymmetric tracking. En: B. D. Roitberg & M. B. Isman (Eds.), *Insect Chemical Ecology: An Evolutionary Approach*. New York, USA. Ed. Chapman and Hall.

Rhode, R. H., D. F. Lopez, F. Eguisa & C. J. Telich (1961). Effect of gamma radiation on the reproductive potential of the Mexican fruit fly. *Journal of Economic Entomology* 54: 202-203.

Robacker, D. C. & I. Fraser (2005). What do Mexican fruit flies learn when they experience fruit? *Journal of Insect Behavior* 18: 529-542.

Rull, J. & A. Barreda-Landa (2007). Colonization of a hybrid strain to restore male *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) mating competitiveness for sterile insect technique programs. *Journal of Economic Entomology* 100: 752-758.

Rull, J., O. Brunel & M. E. Mendez (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.

Rull, J., F. Diaz-Fleischer & J. Arredondo (2007). Irradiation of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) revisited: optimizing sterility induction. *Journal of Economic Entomology* 100: 1153-1159.

Ryan, M. J. (1998). Sexual selection, receiver biases, and the evolution of sex differences. *Science* 281: 1999.

Shelly, T., C. Dang & S. Kennelly (2004). Exposure to orange (*Citrus sinensis* L.) trees, fruit, and oil enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata* [Wiedemann]). *Journal of Insect Behavior* 17: 303-315.

Shelly, T., J. Edu, E. Smith, K. Hoffman, M. War, R. Santos, A. Favela, R. Garagliano, B. Ibewiro & D. McInnis (2007). Aromatherapy on a large scale: exposing entire adult holding rooms to ginger root oil increases the mating competitiveness of sterile males of the Mediterranean fruit fly in field cage trials. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 123: 193-201.

Shelly, T. E. (2001). Exposure to a-copaene and a-copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94: 497-502.

- Shelly, T. E. (2005). Does mating with ginger root oil-exposed males confer fitness benefits to female Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 37: 65-71.
- Shelly, T. E. & A. L. M. Dewire (1994). Chemically mediated mating success in male Oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87: 375-382.
- Shelly, T. E., J. Edu, E. Pahio & J. Nishimoto (2007). Scented males and choosy females: Does male odor influence female mate choice in the Mediterranean Fruit Fly? *Journal of Chemical Ecology* 33: 2308-2324.
- Shelly, T. E. & S. Kennelly (2002). Influence of male diet on male mating success and longevity and female remating in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist* 85: 572-579.
- Shelly, T. E., S. S. Kennelly & D. O. McInnis (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.
- Shelly, T. E. & D. O. McInnis (2003). Influence of adult diet on the mating success and survival of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from two mass-rearing strains on field-caged host trees. *Florida Entomologist* 86: 340-344.
- Shelly, T. E., D. O. McInnis, E. Pahio & J. Edu (2004). 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.
- Shelly, T. E., D. O. McInnis, C. Rodd, J. Edu & E. Pahio (2007). Sterile insect technique and Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Assessing the utility of Aromatherapy in a hawaiian coffee field. *Journal of Economic Entomology* 100: 273-282.
- Shelly, T. E., A. S. Robinson, C. Caceres, V. Wornoyaporn & A. Islam (2002). Exposure to ginger root oil enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from a genetic sexing strain. *Florida Entomologist* 85: 440-445.
- Shelly, T. E. & E. M. Villalobos (2004). Host plant influence on the mating success of male Mediterranean fruit flies: variable effects within and between individual plants. *Animal Behaviour* 68: 417-426.
- Shelly, T. E. & T. S. Whittier (1997). Lek behavior of insects. En: J. Choe & B. Crespi (Eds.), *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*. Cambridge. Ed. Cambridge University Press.
- Siegel, S. & N. J. Castellan (1988). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York, USA. Ed. McGraw-Hill.
- Sivinski, J. M., N. Epsky & R. R. Heath (1994). Pheromone deposition on leaf territories by male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior* 7: 43-51.

Thornhill, R. & J. Alcock (1983). *The Evolution of Insect Mating Systems*. Cambridge, MA, USA. Ed. Harvard University Press.

Thorpe, W. H. & F. G. W. Jones (1937). Olfactory conditioning in a parasitic insect and its relation to the problem of host selection. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 124: 56-81.

Toledo, J., J. Rull, A. Oropeza, E. Hernández & P. Liedo (2004). Irradiation of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) revisited: optimizing sterility induction. *Journal of Economic Entomology* 97: 383-389.

Tregenza, T. & N. Wedell (2000). Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review. *Molecular Ecology* 9: 1013-1027.

Walder, J. M. M. & C. O. Calkins (1993). Effects of gamma radiation on the sterility and behavioral quality of the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Scientia Agricola* 50: 157-165.

West-Eberhard, M. J. (1984). Sexual selection, competitive communication and species-specific signals in insects. En: T. Lewis (Eds.), *Insect Communication*. Toronto, Canada. Ed. Academic Press.

Whittier, T. S., F. Y. Nam, T. E. Shelly & K. Y. Kaneshiro (1994). Male courtship success and female discrimination in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior* 7: 159-170.

Wood, D. L. (1982). The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual Review of Entomology* 27: 411-46.

Yuval, B., R. Kaspi, S. Shloush & M. S. Warburg (1998). Nutritional reserves regulate male participation in Mediterranean fruit fly leks. *Ecological Entomology* 23: 211-215.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Michigan, USA. Ed. Prentice Hall.

Zurlini, G. & A. S. Robinson (1980). The effect of crowding on adult populations of *Delia* (= *Hylemya*) *antiqua* (Meigen). *Population Ecology* 22: 228-241.