



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Cuantificación y análisis de la transferencia de espermatozoides en *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae): Aplicaciones en programas de la Técnica del Insecto Estéril

MARTA CATALÀ OLTRA

DIRECTORES:
Merixell Pérez Hedo
Elena Llácer Archelós
Alberto Urbaneja García

SEPTIEMBRE 2024

**Cuantificación y análisis de la transferencia de
espermatozoides en *Ceratitis capitata* Wiedemann
(Diptera: Tephritidae): Aplicaciones en programas
de la Técnica del Insecto Estéril**

MARTA CATALÀ OLTRA

DIRECTORES:

MERITXELL PÉREZ HEDO

ELENA LLÁCER ARCELÓS

ALBERTO URBANEJA GARCÍA



UNIVERSITAT
POLITECNICA
DE VALÈNCIA

Septiembre 2024

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.1. La mosca mediterránea de la fruta, <i>Ceratitis capitata</i>	3
1.1.1. Clasificación taxonómica e importancia de los tefrítidos plaga	3
1.1.2. Morfología, biología y ecología	9
1.1.3. Síntomas y naturaleza de los daños en frutos.....	14
1.1.4. Distribución geográfica y capacidad invasiva.....	16
1.2. Estrategias de gestión en campo contra <i>Ceratitis capitata</i>	19
1.2.1. Seguimiento de poblaciones.....	21
1.2.2. Control químico.....	23
1.2.3. Trampeo de control	28
1.2.4. Organismos de control biológico.....	30
1.2.4.1. Parasitoides.....	32
1.2.4.2. Depredadores.....	33
1.2.4.3. Microorganismos entomopatógenos.....	35
1.2.5. Manejo cultural	37
1.2.6. Técnica del Insecto Estéril (TIE)	38
1.2.6.1. Programas TIE internacionales contra <i>Ceratitis capitata</i>	40
1.2.6.2. Programa TIE en la Comunidad Valenciana.....	42
1.3. Biología reproductiva de <i>Ceratitis capitata</i>	46
1.3.1. El sistema reproductivo.....	46
1.3.1.1. Anatomía del sistema reproductivo en las hembras.	46
1.3.1.2. Anatomía del sistema reproductivo en los machos.....	47
1.3.2. Espermatogénesis.	48

1.3.3. Apareamiento y transferencia de esperma	49
1.3.4. Esterilidad inducida por radiación	53
1.4. Justificación y objetivos	55

Capítulo 2. Desarrollo y validación de un método PCR a tiempo real para estimar el esperma almacenado en espermatecas 59

2.1. Introducción	61
2.2. Material y métodos	63
2.2.1. Colonias de <i>Ceratitis capitata</i>	63
2.2.1.1. Cepa silvestre	63
2.2.1.2. Cepa Vienna-8 estériles	65
2.2.2. Manejo de las moscas y experimentos de acoplamiento en laboratorio	65
2.2.3. Disección de las espermatecas	67
2.2.4. Extracción de ADN	68
2.2.5. Diseño de marcadores y test de detección	69
2.2.6. Preparación de la curva estándar para la PCR en tiempo real	71
2.2.7. Amplificación PCR en tiempo real	74
2.2.8. Validación del método	75
2.2.8.1. Recuentos de espermatozoides en microscopio	75
2.2.8.2. PCR convencional semicuantitativa	76
2.2.9. Análisis de datos	78
2.3. Resultados	79
2.3.1. Desarrollo del método PCR a tiempo real basado en el cromosoma Y	79
2.3.2. Validación del método PCR a tiempo real para la cuantificación del esperma transferido	82
2.4. Discusión	85

Capítulo 3. Análisis cuantitativo de la transferencia de esperma en machos silvestres y estériles: efecto de la duración del acople y la edad de los machos 89

3.1. Introducción	91
-------------------------	----

3.2. Material y métodos.....	94
3.2.1. Experimentos de acoplamiento.....	94
3.2.2. Aislamiento de espermatecas, extracción de ADN y PCR cuantitativa en tiempo real.....	95
3.2.3. Análisis de datos.....	95
3.3. Resultados.....	96
3.3.1. Evaluación de la transferencia efectiva de esperma en los acoplamientos.....	96
3.3.2. Cuantificación relativa del esperma transferido en los acoplamientos.....	99
3.4. Discusión.....	104
Fertilidad de las cópulas.....	104
Abundancia del esperma transferido.....	105

Capítulo 4. Recópula y transferencia de esperma en machos estériles..111

4.1. Introducción.....	113
4.2. Material y métodos.....	116
4.2.1. Experimentos de recópula.....	116
4.2.2. Cuantificación del esperma transferido.....	119
4.2.3. Análisis de datos.....	120
4.3. Resultados.....	121
4.3.1. Respuesta de reapareamiento de los machos estériles.....	121
4.3.2. Análisis del esperma transferido en los reacoplos.....	123
4.4. Discusión.....	125

Capítulo 5. Discusión general 131

Desarrollo de un método para la cuantificación de espermatozoides contenidos en las espermatecas mediante técnicas moleculares en <i>Ceratitis capitata</i>	133
Análisis de la transferencia efectiva de espermatozoides y revisión de los patrones de transferencia según la duración de la cópula en <i>C. capitata</i>	134
Respuesta de recópula en machos estériles Vienna-8.....	137
Perspectivas futuras.....	138

Capítulo 6. Conclusiones.....141

Bibliografía145

Información complementaria.....193

Resumen.....201

Resum.....205

Summary209

Agradecimientos.....213

Introducción General



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. La mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata*

1.1.1. Clasificación taxonómica e importancia de los tefritidos plaga

El orden Diptera constituye uno de los grupos de insectos más diversos en todo el planeta y posiblemente uno de los más ubicuos; se les encuentra en casi todos los hábitats terrestres y de agua dulce, y algunos incluso hacen incursiones en el entorno marino el cual se encuentra casi libre de insectos (Marshall, 2012) (Figura C1.01). En este orden se incluyen algunas especies de importancia en la salud humana y animal al tratarse de vectores de enfermedades graves como la malaria, el dengue o la fiebre amarilla, que pueden causar la muerte de miles de personas al año (Bellekom y col., 2021). Pero al mismo también pertenecen muchas especies, miles de ellas, beneficiosas; especies que contribuyen a la polinización, al control biológico de plagas o a la descomposición de la materia orgánica (Marshall, 2012). Aunque su hábito más generalizado es el saprofítico, entre los dípteros encontramos especies fitófagas que pueden alimentarse de una gran variedad de tejidos vegetales (frutos, tallos, hojas y raíces), y entre ellas hay algunas consideradas como plagas cuarentenarias y/o de gran impacto económico a nivel mundial (White y Elson-Harris, 1992).

Dentro del orden Diptera, la familia Tephritidae, con 492 géneros y alrededor de 4.716 especies, se encuentra entre las familias más grandes del orden y posee una amplia distribución mundial (región Oriental, Afrotropical, Australiana, Paleártica, Neártica y Neotropical), aunque la mayor parte de sus especies están registradas en las regiones tropicales y subtropicales (Pape y col., 2011).

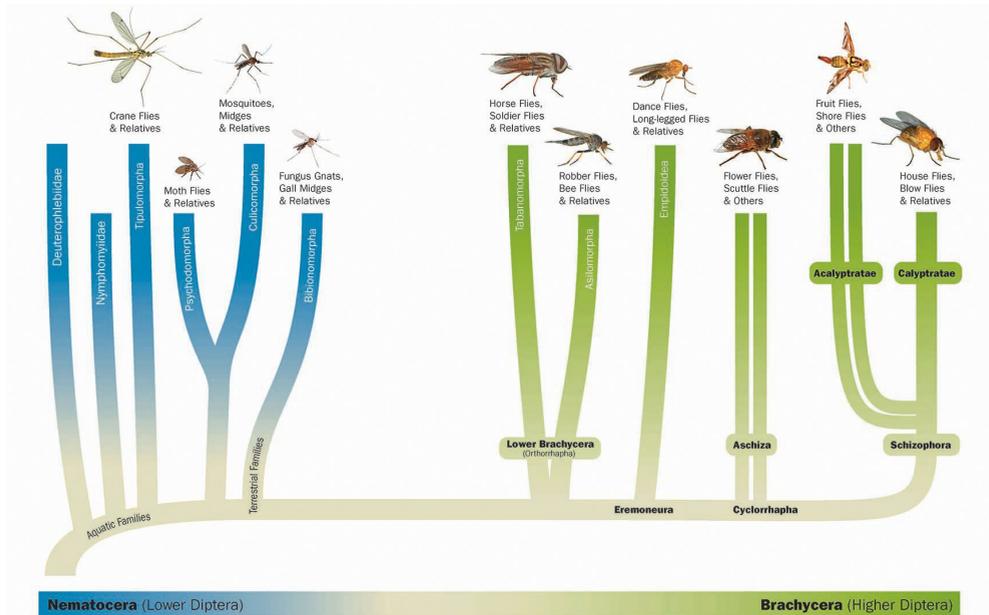


Figura C1.01 | Diversidad evolutiva del orden Diptera obtenido de Marshall (2012).

En la familia Tephritidae se reconocen 5 subfamilias mayormente fitófagas: Phytomyiinae, Blepharoneurinae, Tephritinae, Trypetinae y Dacinae, estando en las dos últimas subfamilias las especies de mayor interés económico; se las conoce como moscas de la fruta porque sus larvas se desarrollan en el interior de frutos blandos, tanto silvestres como cultivados, y en casi todas las áreas frutícolas del mundo se encuentra alguna especie considerada plaga (White y Elson-Harris, 1992). Hay otras familias de dípteros (Drosophilidae, Lonchaeidae, Muscidae o Neriidae), asociadas también a los frutos y materia en descomposición, pero a diferencia de los Tephritidae, se considera que producen en la mayoría de los casos, invasiones secundarias en frutos ya previamente dañados (White y Elson-Harris, 1992).

Los tefrítidos, y particularmente los de la subfamilia Dacinae, a la que pertenece *Ceratitis capitata* Wiedemann (Figura C1.02) es uno de los grupos de insectos más difíciles de estudiar taxonómicamente debido principalmente a la dificultad de encontrar caracteres taxonómicos sólidos, lo cual ha dado lugar a muchas sinonimias, homonimias e identificaciones incorrectas (Drew, 1989). Un claro ejemplo de ello es

la especie *Bactrocera dorsalis* Hendel, cuya complicada historia taxonómica ha dado lugar a la descripción del complejo “Mosca de la fruta Oriental” en la cual después de diversos análisis, varias especies (*B. papayae* Drew y Hancock, *B. invadens* Drew, Tsuru y White y *B. philippinensis* Drew y Hancock) se han establecido como variantes de *B. dorsalis* (Naeole y Haymer, 2003; Mahmood, 2004).

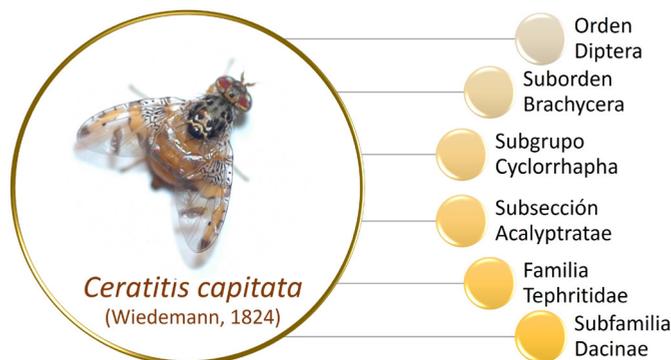
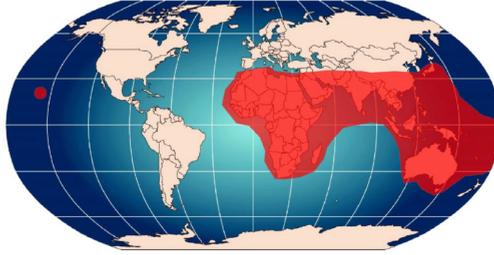


Figura C1.02 | Clasificación taxonómica actual de *Ceratitis capitata*. Sinonimias: *Ceratitis citriperda* MacLeay, *Ceratitis hispanica* De Brême, *Pardalaspis asparagi* Bezzi, *Tephritis capitata* Wiedemann. Nombre común en castellano “mosca de la fruta del mediterráneo” y “mediterranean fruit fly” o “medfly” en países de habla angloamericana.

Los géneros de Tephritidae donde se hallan las especies con mayor riesgo de constituir plaga son *Anastrepha* (Schiner), *Bactrocera* (Macquart), *Dacus* (Fabricius), *Ceratitis* (MacLeay) y *Rhagoletis* (Loew) (White y Elson-Harris, 1992; Malacrida y col., 2007; De Meyer y col., 2008) (Figura C1.03). Varias de sus especies generan grandes pérdidas económicas en sus regiones biogeográficas de origen, tanto por los daños directos que causan sobre los frutos y que dificultan su comercialización local, como por las pérdidas potenciales en los mercados de exportación, al ser consideradas especies cuarentenarias y estar sometidas a estrictas regulaciones en las zonas catalogadas como libres de ellas, ya que uno de los mayores riesgos de introducción de la especie en estas zonas es mediante la importación de frutos que contengan larvas vivas en su interior (White y Elson-Harris, 1992; Aluja y Mangan, 2008).

En algunos países se estiman pérdidas de cosecha ocasionadas por los tefrítidos de entre el 17 y el 90%, con los valores más altos asociados a zonas donde

1.1 *Dacus* / *Zeugodacus*



1.2 *Rhagoletis*



1.3 *Bactrocera*



1.4 *Ceratitis*



1.5 *Anastrepha*



Figura C1.03 | Distribución global de los géneros *Dacus*/*Zeugodacus*, *Rhagoletis*, *Bactrocera*, *Ceratitis* y *Anastrepha*. Obtenido de Bragard y col. (2020).

no se implementan prácticas de control efectivas (Vayssières y col., 2009; De Meyer y Ekesi, 2016). Sin embargo, no es fácil encontrar referencias donde se cifre su impacto económico real, incluyendo los daños directos sobre los frutos, los costes de las campañas de control, los tratamientos cuarentenarios y/o las pérdidas por bloqueos en la exportación. En el continente africano se estimaron estas pérdidas en aproximadamente 2 billones de dólares (USD) anuales (Ekesi y col., 2016). En España, debido a restricciones fitosanitarias contra *C. capitata*, se produjeron bloqueos en exportaciones que generaron pérdidas cifradas en unos 300 millones de euros (Castañera, 2003). En Brasil, también por *C. capitata*, se cifraron pérdidas económicas de 243 millones de dólares (USD) al año (Oliveira y col., 2013), y en la República Dominicana por detecciones de esta especie en 2015 se generaron pérdidas de 40 millones de dólares (USD) por restricciones en la exportación (Závala-López y col. 2021). En la región euro-mediterránea, la organización intergubernamental para la protección vegetal EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) recoge entre sus recomendaciones dos listas de especies que deberían ser reguladas como plagas cuarentenarias para evitar su introducción y/o expansión. En ellas se incluyen actualmente 23 especies de tefrítidos en la lista EPPO A1 (especies no presentes en la región) y 4 en la lista EPPO A2 (localmente presentes) (EPPO, 2023).

En la región europea se registra actualmente la presencia de aproximadamente 260 especies de tefrítidos (Información complementaria. [Tabla S1](#)) de las cuales se ha citado una tercera parte de estas en España (de Jong y col., 2014; GBIF.org 2024). En el ámbito agronómico español destacan por su afección a los cultivos, los tefrítidos: *Bactrocera oleae* Rossi (mosca del olivo), *C. capitata* (mosca de la fruta del mediterráneo), *Rhagoletis cerasi* Linnaeus (mosca de la cereza) y *Rhagoletis completa* Cresson (mosca del nogal), siendo las dos primeras las más relevantes en términos económicos (Navarro-Llopis y col., 2011).

Las especies de tefrítidos “no europeos” cuyas detecciones se han registrado recientemente en puntos de inspección fronterizos o lugares aislados son motivo de especial preocupación especialmente en la Comunidad Europea (Bragard y col.,

2020). La importancia de estas plagas potenciales radica en su gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales y al daño que pueden causar en un amplio rango de frutos. De las especies interceptadas, en España se incluyen en el Plan Nacional de Contingencia de Tefrítidos “no europeos”: *Anastrepha ludens* (Loew), *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett), *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera latifrons* (Hendel), *Bactrocera zonata* (Saunders), *Ceratitis rosa* (Karsh), *Dacus ciliatus* (Loew), *Dacus frontalis* (Becker), *Dacus vertebratus* (Bezzi) y *Rhagoletis pomonella* (Walsh), especies para las cuales se establece un plan de vigilancia fitosanitario (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, MAPA, 2020)(Figura C1.04). En una publicación reciente en la que se evalúa el riesgo de especies exóticas invasoras no establecidas en España pero que podrían llegar a establecerse y causar un gran impacto ecológico, se listan 47 especies con un riesgo muy alto, entre las cuales se identifican 7 especies de insectos, una de ellas el tefrítido *Rhagoletis cingulata* (Loew) (Cano-Barbacid y col., 2023).



Figura C1.04 | *Bactrocera dorsalis* (izquierda) y *Ceratitis rosa* (derecha) (Diptera: Tephritidae). Obtenidas en Fruit Fly Identification Australia (Plant Health Australia, 2023).

1.1.2. Morfología, biología y ecología

Ceratitis capitata, al igual que los otros miembros del orden Diptera, es un insecto holometábolo, es decir que presenta una metamorfosis completa y pasa durante su ciclo de vida por cuatro estados de desarrollo (huevo, larva, pupa y adulto) (Figura C1.05).

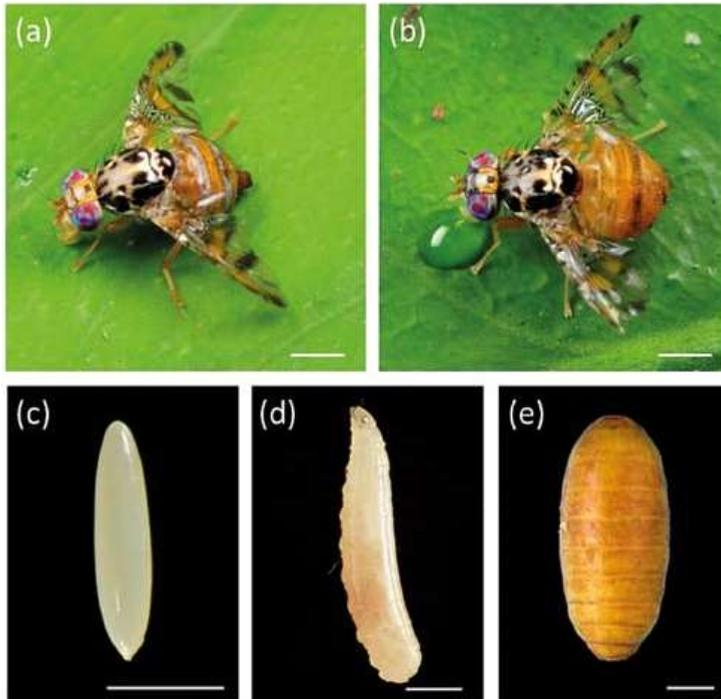


Figura C1.05 | Etapas de desarrollo de *Ceratitis capitata*: (a) hembra adulta, (b) macho adulto, (c) huevo, (d) larva de tercer estadio y (e) pupa. La barra de escala representa 1 mm en todas las imágenes, excepto en (c), en la que corresponde a un cuarto de mm (Crédito: P. Giannotti. Obtenida de Giunti y col., 2023).

El huevo de 1 mm de largo es muy fino y curvado, de color blanco brillante y liso, con una región micropilar claramente tubular.

La larva es elongada y puntiaguda en el extremo de la cabeza; en su primer estadio larvario (L_1) tiene una longitud aproximada de 1 mm y es mayoritariamente transparente; la del segundo estadio (L_2) tiene el cuerpo parcialmente transparente con tonalidades amarillentas o anaranjadas por la presencia de alimento en el

tubo digestivo. El gancho del aparato bucal muestra dos dientes patentes. La larva del tercer y último estadio (L_3), presenta el cuerpo completamente blanco opaco, aunque puede adquirir otra tonalidad según la fruta ingerida; en su desarrollo completo puede tener una longitud entre 6,8 y 8,2 dependiendo de su dieta y sólo muestra el diente exterior del gancho. La identificación de los estadios inmaduros de las moscas de la fruta es extremadamente compleja; se considera que mediante ciertas características morfológicas pueden ser identificadas con certeza larvas maduras (tercer estadio) hasta nivel de género, y en algunos pocos casos hasta nivel de especie en los géneros *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Dacus* y *Ragoletis* (Steck y col., 1990; White y Elson-Harris, 1992; Steck y Ekesi, 2015; Hernández-Ortiz y col., 2020; Carroll y col., 2024). Debido a dicha dificultad, se recomienda el uso de técnicas moleculares para identificar especies a partir de larvas, dejando las técnicas morfológicas para identificar adultos (EPPO, 2011).

La pupa inmóvil, permanece durante su desarrollo en el interior de una cobertura en forma barril segmentado llamada pupario; esta cobertura cilíndrica la forma el insecto a partir de la piel endurecida e inflada del tercer estadio larvario, tiene entre 4,0-4,3 mm de longitud y es de color marrón rojizo que va oscureciendo con la edad.

El adulto tiene una longitud entre 3,5-5,0 mm. Los ojos son morados rojizos con iridiscencia y presentan sedas ocelares. El macho tiene un par de sedas modificadas al lado del margen interno de los ojos cuyo extremo final se ensancha en forma de rombo. Las alas son amplias y hialinas con bandas amarillas y marrones bien extendidas, y en la parte basal presenta un patrón de vetas y manchas típicas de su género, y sedas dorsocentrales ligeramente posteriores a la supra-alar anterior. El postpronoto (humerus) es blanco, con una mancha negra distintiva. El mesonoto, con una base de color negro, presenta un patrón de microtiquios plateados con manchas negras y blancas suturales, y una banda prescutelar blanca. El escutelo es blanco-amarillento en la base y en el ápice con tres machas negras brillantes que se fusionan. El abdomen es oval,

amarillo, con bandas plateadas en los márgenes posteriores del tergum 2 y 4, y finas cerdas negras diseminadas por la superficie dorsal. El ovipositor de la hembra extendido es de 1,2 mm de longitud (Weems, 1981).

Su ciclo de vida empieza cuando las hembras perforan con su ovipositor la piel de los frutos y depositan los huevos a una profundidad entre 1 y 4 mm (Bodenheimer, 1951). En cada puesta pueden llegar a depositar hasta 8-14 huevos (Ruiz-Castro, 1945; Weems, 1981; McDonald y McInnis, 1985); a veces las hembras aprovechan roturas ya producidas en la piel por la madurez del fruto o bien algún orificio de oviposición producido por otra hembra para depositar allí mismo sus huevos, llegándose a encontrar grupos de 75 ó más huevos (Weems, 1981). Durante todo su periodo reproductivo puede llegar a poner entre 300 y 800 huevos si las condiciones son favorables (Weems, 1981; Aluja y Liedo, 1993).

Cuando los huevos eclosionan, las pequeñas larvas penetran hacia el interior del fruto alimentándose de la pulpa y generando galerías que son utilizadas por varias de ellas, que suelen permanecer juntas hasta su completo desarrollo.

Al completar las larvas su tercer estadio, estas abandonan el fruto para enterrarse en los primeros centímetros del suelo y pupar (Jackson y col., 1998; Ali-Ahmed D. y col., 2007). El estadio de pupa se inicia cuando la exuvia de la última muda se endurece; se convierte en una cubierta protectora en el interior de la cual se desarrollan profundas transformaciones que culminan con la consecución de la fase de adulto.

El adulto, con la ayuda de una estructura en forma de globo situada en la parte frontal de la cabeza llamada *ptilinum*, rompe la cubierta transversalmente por una sutura circular situada en el extremo antero-distal y emerge del pupario. Con la ayuda del *ptilinum* y mediante la contracción y elongación de su cuerpo, consigue salir a la superficie del suelo al cabo de varios minutos. Los adultos se alimentan de carbohidratos y proteínas que adquieren de sustancias muy diversas como

jugos de frutas en descomposición, néctar (florales y extraflorales), savia, melazas, excrementos de aves, insectos en descomposición o sustratos bacterianos presentes en las plantas (Christenson y Foote, 1960; Bateman, 1972; Drew y col., 1983; Hendrichs y col., 1991; Vijaysegaran y col., 1997) (Figura C1.06). Una vez alcanzan la madurez sexual se inicia el periodo de cópula y se cierra el ciclo con la puesta de huevos.



Figura C1.06 | Adulto de *Ceratitis capitata* alimentándose de gotas de melaza en una hoja de naranjo.

El tiempo requerido para completar el ciclo de vida puede variar en función de las condiciones ambientales (temperatura principalmente) y el tipo de hospedero o alimento. En condiciones de laboratorio a 25°C, la duración aproximada de los estados de huevo, larva y pupa es de 2, 8 y 12 días, respectivamente, siendo dicha duración inversamente proporcional a la temperatura (Tabla C1.01) (Bodenheimer, 1951). El desarrollo de las larvas cesa por debajo de los 5°C y el de las pupas por debajo de los 13°C (Shoukry y Hafez, 1979).

Muchas larvas mueren antes de completar su desarrollo, se ha llegado incluso a registrar en ocasiones una mortalidad larvaria de entre el 95 y 100% (Bodenheimer, 1951; Garrido y Ventura, 1993). Esta elevada mortalidad se ha asociado a frutos maduros muy jugosos (Weems, 1981), a los aceites esenciales con los que entran

Tabla C1.01 | Efecto de la temperatura sobre el desarrollo de los estadios inmaduros en *Ceratitis capitata* para el rango de temperaturas de 12 a 35°C. Duración expresada en días (Bodenheimer, 1951).

Temperatura (°C)	Huevo	Larva	Pupa	Total
35	1,0	4,7	7,2	12,9
30	1,2	5,8	9,0	16,0
25	1,7	7,7	11,9	21,4
20	2,6	11,5	17,7	31,8
15	4,4	22,7	34,3	51,4
12	9,7	53,6	79,1	142,4

en contacto, a la resistencia mecánica que puede ofrecer la corteza del fruto y a la exudación de gomas que pueden asfixiar a las larvas (Moner y col., 1988). En los frutos cítricos como limones o pomelos se ha observado que la mortalidad larvaria aumenta notablemente y las larvas sufren un retraso en su desarrollo, efectos que se atribuyen a su acidez y a la presencia de los aceites esenciales en la corteza (Bodenheimer, 1951; Spittler y col., 1984; Laborda y col., 1990).

La longevidad de los adultos difiere entre sexos y depende principalmente de la temperatura, la nutrición y su actividad reproductiva (Christenson y Foote, 1960). En condiciones de laboratorio y con dieta artificial, se ha observado que los machos pueden vivir un promedio de 36 días a 25°C, mientras que las hembras, a la misma temperatura, lo hacen 31 días de promedio, aunque si se crían sin machos puede alcanzar los 67 días (Shoukry y Hafez, 1979). El periodo de preoviposición en las hembras puede variar de 5 días a 12 cuando se reduce la temperatura de 25 a 20°C (Bodenheimer, 1951), y no realizan la puesta a temperaturas inferiores a los 16°C, excepto cuando se exponen a la luz del sol durante varias horas (Bodenheimer, 1951; Gómez-Clemente y Planes, 1952; Weems, 1981).

En campo, el número de generaciones que esta especie puede completar durante un año varía en función de los factores climáticos y de la presencia de cultivos que le proporcionen frutos hospederos. En España, y teniendo en cuenta

sus requerimientos térmicos, en las zonas con temperaturas mínimas invernales por encima de 0° C puede completar de cinco a ocho generaciones al año; el número de generaciones se reduce a tres o cuatro en zonas de clima templado, con inviernos más fríos y sin frutos disponibles desde otoño a primavera (Moner y col., 1988; García Marí y col., 2002).

En la costa mediterránea española, concretamente en las zonas de cultivo de la Comunidad Valenciana y Región de Murcia, las condiciones de temperatura suave junto con la disponibilidad de fruta madura escalonada hacen que la secuencia biológica de *C. capitata* muestre un solapamiento entre generaciones (multivoltina) que da lugar a una presencia continua de adultos durante prácticamente todo el año (Gómez-Clemente y Planes, 1952; García Marí y col., 2002; Navarro y col., 2008). En las áreas citrícolas valencianas se encuentran hembras en todos los estados de desarrollo a lo largo de todo el año, manteniéndose incluso una población invernante, y la pauta general en su distribución estacional se caracteriza por un incremento poblacional en junio y un máximo en julio (Navarro y col., 2008; Martínez-Ferrer y col., 2010). Aunque *C. capitata* no tiene preferencia por los cítricos, éstos contribuyen a mantener la población en invierno, sobretudo aquellas variedades extratempranas de cítricos (Clausellina, Oroval, Clemenpons, Okitsu, etc.) cuya recogida concatena con el final de las frutas de verano (Figura C1.07).

1.1.3. Síntomas y naturaleza de los daños en frutos

Los daños que *C. capitata* puede ocasionar en los frutos se producen primero con la picadura de puesta de las hembras, a lo que después se añade el efecto de las larvas al alimentarse de la pulpa del fruto.

La hembra para realizar la puesta atraviesa con su ovipositor la corteza y en ese momento produce pequeñas roturas en la superficie del fruto; tras estas punciones se queda una herida sobre la superficie del fruto que según el tipo de corteza y del grosor o resistencia de la misma, puede desencadenar en una reacción necrótica a su alrededor con el consecuente cambio de color que hace que pierda

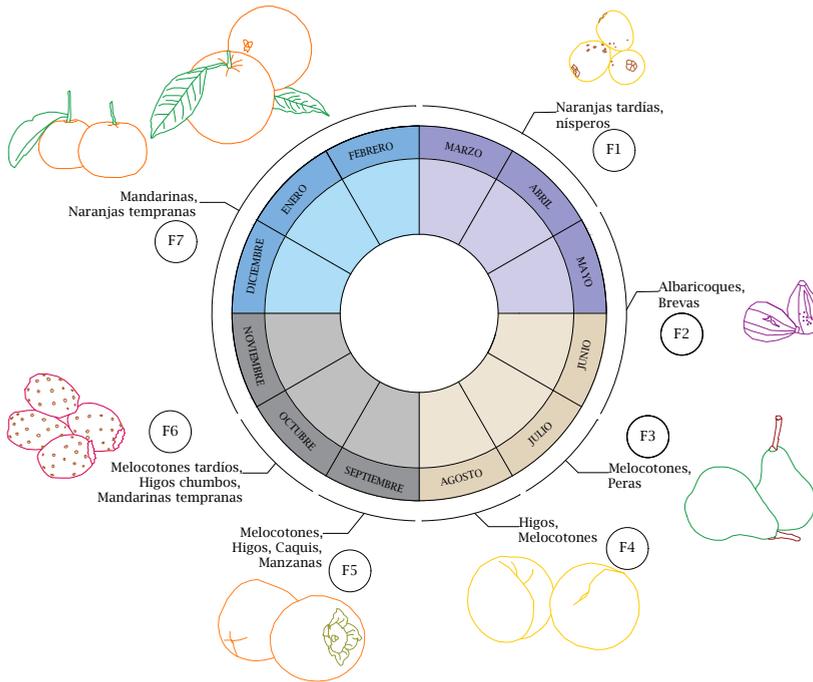


Figura C1.07 | Secuencia biológica típica de *Ceratitidis capitata* sobre diferentes frutos hospedantes en la Comunidad Valenciana. Las generaciones anuales pueden variar según las condiciones climáticas concretas de cada año y zona. Elaborado a partir de los datos de Gómez-Clemente y Planes (1952).

valor comercial. En algunas frutas con un contenido muy alto de azúcar (por ejemplo, *Prunus persica* (L.) Batsch) exudan glóbulos de azúcar que generalmente son visibles alrededor de la punción de la oviposición (White y Elson-Harris, 1992) (Figura C1.08).

Con la eclosión de las larvas, éstas empiezan a alimentarse produciendo galerías en el interior de los frutos, una actividad que da lugar a reacciones que favorecen los procesos de oxidación, lo cual provoca la maduración prematura del fruto y su caída del árbol. Estas galerías, junto con las punciones de puesta realizados por la hembra y los orificios de salida de la larva de tercer estadio, actúan también de entrada de patógenos secundarios como bacterias u hongos, que aceleran la descomposición del fruto, ocasionando al final su desvalorización o pérdida comercial total. (Back y Pemberton, 1915; Cayol y col., 1994; Vayssières y col., 2009).



Figura C1.08 | Fruto con daños por ataque de *C. capitata* en mandarina (izquierda) y melocotón (derecha). En el fruto de melocotón se observa los exudados de azúcar consecuencia de las picaduras de oviposición y un orificio de salida con una larva L_3 abandonando el fruto para pupar en el suelo.

Estos daños pueden expresarse en campo o también durante el transporte y la distribución comercial. En la Comunidad Valenciana se estima que puede potencialmente dañar a más de un millón de toneladas de cítricos y otras frutas en esta región (Plá y col., 2021).

1.1.4. Distribución geográfica y capacidad invasiva

Ceratitis capitata es una especie originaria del África subsahariana, aunque su procedencia geográfica exacta aún sigue en debate. Algunos análisis filogenéticos, de presencia de hospederos y parasitoides, así como de abundancia y distribución tanto de la especie en cuestión como de sus congéneres, indican que probablemente sea de las regiones africanas del este o sur (De Meyer y col., 2002; Deschepper y col., 2021).

Desde su región de origen, se extendió, por prácticamente todo el continente africano, hasta llegar al área Mediterránea. En 1842 se registra su presencia por primera vez en España y posteriormente se empieza a detectar por otros países de la cuenca mediterránea (Fimiani, 1989); actualmente se encuentra por muchas regiones tropicales, subtropicales y templadas de los

dos hemisferios (entre los paralelos 48 Norte y 45 Sur), y amenaza con invadir o reinvasir nuevas áreas (CABI, 2020) (Figura C1.09).

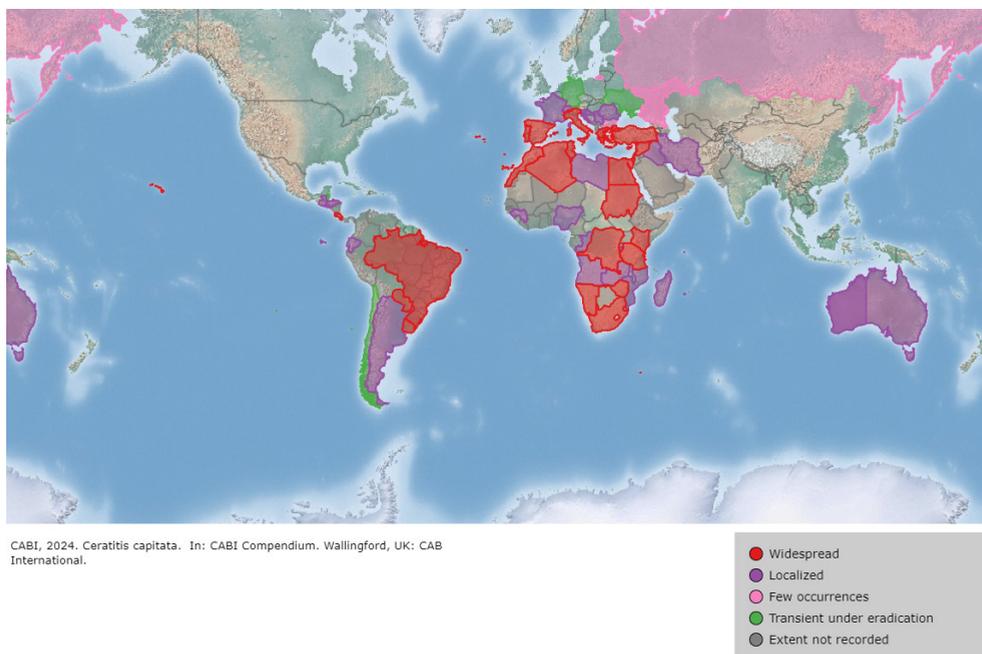


Figura C1.09 | Distribución mundial de *Ceratitis capitata*. Obtenido en CABI Compendium (CABI, 2020).

Ceratitis capitata está incluida en la lista A2 EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), que corresponde a especies que están localmente presentes en la región euromediterránea pero se recomienda que deben ser reguladas como plagas cuarentenarias. A nivel mundial también está catalogada por otros organismos como especie de importancia cuarentenaria (APPPC-Asia and Pacific Plant Protection Commission, EAEU-Eurasian Economic Union, OIRSA-Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, PPPO-Pacific Plant Protection Organization), especialmente para Japón y Estados Unidos, ya que ha alcanzado todas las masas de tierra tropicales y templadas con la excepción de Asia. Su presencia en Hawái y en algunos países del Centro y Sur de América, así como algunas incursiones en ciertas zonas del Norte de América (California y Florida) sujetas a estrictas medidas de

erradicación (EPPPO, 2011), ha contribuido a su alto perfil internacional como plaga cuarentenaria, provocando fuertes limitaciones de comercialización de frutas a regiones cálidas o templadas donde aún no está establecida.

Su potencial colonizador ha sido analizado a través de datos genéticos y biológicos, y son varios los factores a los cuales se atribuye su alta capacidad invasiva (Malacrida y col., 2007). Entre los tefritidos, es el que muestra una mayor polifagia conocida: su rango de hospederos varía de una región a otra según las frutas disponibles, y se ha confirmado su presencia en condiciones naturales en 419 taxones de plantas pertenecientes a 175 géneros, a su vez integrados en 68 familias diferentes (Liquido 2020). Entre sus hospederos hay especies cultivadas y silvestres; en la región euromediterránea los hospederos principales son *Malus pumila* Mill., *Prunus* sp.L., *Eriobotrya japonica* (Thunb) Lindl., *Pyrus communis* L.(Rosaceae), *Citrus* sp. L. (Rutaceae), *Ficus carica* L. (Moraceae), *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae), *Actinidia deliciosa* Chev. (Actinidiaceae) y *Persea americana* Mill. (Lauraceae) (OEPP/EPPPO, 2011), pero no hay que olvidar en ciertas áreas la gran importancia de los hospederos silvestres como reservorios de poblaciones de *C. capitata* (CABI, 2020).

Presenta una amplia plasticidad ambiental lo cual hace que encontremos poblaciones en diferentes regiones bioclimáticas; se desarrolla en clima tropical de sabana (As y Aw), en semiárido (BS) y templado (Cf, Cs y Cw), y también admite el clima tropical monzónico (Aw) y el desértico (BW) (CABI, 2020). Su tolerancia térmica se ha demostrado tanto condiciones de laboratorio (Nyamukondiwa y col., 2010; Weldon y col., 2011, 2018) como de campo (Nyamukondiwa y col., 2013). Dicho rango de temperaturas explicaría su éxito en la colonización de zonas de clima templado, así como su capacidad para adaptarse a pasar el invierno como larva dentro del fruto o como pupa en el suelo, y reinvasir territorios tan pronto como las condiciones ambientales se vuelven más favorables (Carey, 1991; Malacrida y col., 1992; Papadopoulos y col., 1996; Israely y col., 1997; De Meyer y col., 2002; Peñarrubia-María y col., 2012). Su éxito biológico se apoya por numerosas adaptaciones morfológicas, fisiológicas y de comportamiento

que involucran cada etapa de su ciclo de vida, desde los huevos hasta los adultos, y que le han permitido prosperar en diversas condiciones climáticas y hábitats tanto naturales como cultivados (Yuval y Hendrichs, 2000).

Es importante considerar también el impacto del comercio global y los efectos del cambio climático en la variabilidad de la distribución de las poblaciones de *C. capitata* de una temporada a otra. Un ejemplo de esto son las detecciones ocasionales en Alemania y Ucrania, lo que lleva a que estas regiones estén sujetas a campañas de erradicación, a pesar de que *C. capitata* no logra sobrevivir allí durante el invierno (EPPPO, 2021). Se están utilizando modelos bioclimáticos predictivos para evaluar las áreas que podrían ser potencialmente invadidas por este tefrítido (Vera y col., 2002a; De Meyer y col., 2008; Gilioli y col., 2021) con el objetivo de establecer mapas de riesgo de invasión, especialmente, en aquellas zonas libres de esta plaga.

En España se distribuye por todo el territorio peninsular, las islas Baleares y las Canarias (Ros Amador, 1988; EPPPO, 2016), aunque su presencia es más abundante por toda la costa este y sur de la península, gracias a la presencia de amplias zonas cultivadas con gran variedad de cítricos: naranjos dulces (*Citrus sinensis* L.) clementinos (*C. reticulata* Blanco) y satsumas (*C. unshiu* Marc.), en coexistencia con otros frutales: albaricoqueros (*Prunus armeniaca* L.), caquis (*Diospyros kaki*), ciruelos (*Prunus domestica* L.), higueras (*Ficus carica* L.), azufaifos (*Ziziphus jujuba* Mill.), melocotoneros (*Prunus pérsica* L.) y nísperos (*Eriobotrya japónica* Thumb.). Esta alta disponibilidad de hospederos junto con las condiciones climáticas favorables (inviernos suaves) hacen posible encontrar adultos de *C. capitata* durante todo el año (Martínez-Ferrer y col., 2010).

1.2. Estrategias de gestión en campo contra *Ceratitidis capitata*

Actualmente la mayor parte de los planes de gestión de tefrítidos a nivel mundial se desarrollan bajo el concepto de manejo integrado de plagas en grandes áreas (AW-IPM, del inglés *Area wide Integrated Pest Management*). Este concepto

apunta a la gestión efectiva de la población de una determinada plaga mediante la integración de diversas tecnologías y herramientas de control (genéticas, biológicas, etc.) cuya implementación va enfocada a gran escala. La intervención en grandes áreas busca evitar la fragmentación en la gestión de las poblaciones, algo común en el control convencional de plagas, que tiende a realizarse de manera localizada, campo por campo, sin considerar el movimiento de insectos. Al coordinar esfuerzos en áreas más grandes, que abarquen no solo terrenos agrícolas sino también áreas naturales con presencia de la plaga, se logra un control más efectivo en todo el territorio, se reducen las acciones de control necesarias y se previenen reinfestaciones desde los alrededores de las zonas agrícolas.

El AW-IPM adopta una estrategia preventiva en lugar de reactiva; por ejemplo, seleccionando el momento en que las poblaciones de plagas son más vulnerables, lo que requiere a largo plazo menos insumos y resulta en una gestión de plagas más rentable y sostenible. Estos programas de AW-IPM requieren la participación coordinada de todos los sectores implicados en la cadena de producción, así como la financiación del sector público ya que su implementación tiene efectos no solo en el ámbito económico y medioambiental, sino también social (Dyck y col., 2021; Hendrichs y col., 2021a).

Son muchos los países a nivel mundial que presentan programas de erradicación o gestión integrada contra *C. capitata*. Un ejemplo reciente es el de la República Dominicana donde oficialmente en 2015 se detectó su presencia y tras implantar un programa AW-IPM, en 2017 consiguió con éxito su erradicación (Zavala-López y col., 2021). En España, por el Real Decreto 461/2004, de 18 de marzo, por el que se establece el Programa nacional de control de la mosca mediterránea de la fruta, se califica de utilidad pública la prevención y lucha contra este tefrítido, y desde 2004 se establece un programa nacional de control en el cual se contemplan un conjunto de posibles medidas fitosanitarias con el objetivo de reducir las poblaciones a niveles que causen menos daños; programa que es obligada aplicación en las comunidades autónomas en las cuales se ha declarado la existencia de la plaga.

En la Comunidad Valenciana, aunque ya se citaba con anterioridad la presencia de *C. capitata* en el ámbito científico-académico, en 2004 se establecen las medidas obligatorias para la lucha contra esta plaga, medidas que son recogidas en un plan anual de actuación (*Orden, de 5 de julio de 2004, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se establece el plan valenciano de actuación contra la mosca de las frutas* publicado en el Diario Oficial de la Generalitat Valenciana núm. 18396 de 09.07.2004). Actualmente, la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, incorpora en su campaña anual de lucha contra *C. capitata* (Generalitat Valenciana, 2024) las siguientes actuaciones:

- i. El seguimiento de poblaciones en campo mediante la instalación de una red de trampas de monitoreo.
- ii. La aplicación de tratamientos químicos terrestres y aéreos en focos de forma colectiva
- iii. El trampeo masivo y el control de hospedantes aislados de *C. capitata* en áreas estratégicas
- iv. El reparto de fitosanitarios y la información al sector sobre el estado de la plaga sobre el territorio.
- v. La aplicación de la técnica del insecto estéril (TIE) en áreas cítricas, lo cual conlleva la cría en masa, esterilización, manipulación y liberación de machos estériles de la cepa de sexado genético (GSS) de *C. capitata*.

1.2.1. Seguimiento de poblaciones

El seguimiento de poblaciones se realiza a través de una red de monitorización constituida por trampas (mosqueros) distribuidas por aquellas zonas frutícolas donde se quiere obtener información del estado de las poblaciones silvestres. Existen en el mercado muchos tipos de mosqueros, con diseños muy diversos en cuanto a color, forma o material; también hay disponibles diferentes atrayentes y difusores que se emplean conjuntamente no sólo para el seguimiento de poblaciones sino también en el método de control de trampeo masivo.

La red de monitorización gestionada por la Generalitat Valenciana para *C. capitata* consiste en 1000 mosqueros tipo Nadel, cebados con un atrayente sexual de machos (Trimedlure), y 200 tipo Tephri, con un atrayente alimenticio amónico, que atrae en mayor medida a las hembras, y un insecticida (Tabla C1.02). La trampa Tephri es una modificación de la trampa McPhail con la base de embudo invertido y cuatro orificios laterales; la trampa Nadel presenta varios orificios laterales y una cesta porta-feromona en su interior. Ambas se utilizan en la red como trampas secas y están registradas en España para monitorización de *C. capitata* (MAPA, 2024a). Cada una de estas trampas está georeferenciada y se inspecciona semanalmente, anotando el número de adultos encontrados. Con los datos obtenidos se elaboran gráficos, que muestran los niveles poblacionales de adultos a lo largo del año, y mapas de riesgo, que relacionan éstos con la densidad de variedades tempranas y extratempranas de cítricos presentes.

Tabla C1.02 | Atrayentes y difusores empleados en la red de monitorización de la Generalitat Valenciana para el seguimiento de las poblaciones en campo de *C. capitata*.

Trampa	Atrayente y difusor	Insecticida
Tephri (TP)	Atrayente amónico Ceratitis V29 (CECAA012V3): acetato de amonio (75 % p/p), trimetilamina (8,3 % p/p) y 1,4-diaminobutano (0,33 %p/p). Difusor: sobre OPET de 100X107,5 mm dotado de un orificio transpirable de fibra de PE de 29 mm de diámetro.	34203 KENOSTRIP 10; diclorvos 20%).
Nadel	Paraferomona (feromona sintética): Zentinel ® TML 150 (VP). Trimedlure (0.6g/difusor). Difusor: "plugs"	34203 KENOSTRIP 10; diclorvos 20%).

Para establecer pautas generales por zonas frutícolas es clave que la monitorización se realice en zonas amplias y con una alta densidad de trampas, pues las capturas de adultos de *C. capitata* en trampas individuales pueden ser muy variables tanto en abundancia como en evolución estacional, incluso en trampas situadas muy próximas (Navarro y col., 2008). En los campos de cítricos, el seguimiento de las capturas refleja que los factores locales (proximidad de

las trampas a otros frutos maduros no comerciales, mayor exposición directa al sol o el viento, etc.) son claves para explicar cambios en la abundancia anual y la distribución estacional (Martínez-Ferrer y col., 2010). Al final, el análisis en conjunto de todas las trampas de la red va a permitir establecer unas pautas en la abundancia de las poblaciones que contribuyan a garantizar una mayor eficiencia en la gestión de la plaga en el territorio.

1.2.2. Control químico

Durante las últimas décadas los insecticidas de amplio espectro (principalmente organofosforados) han sido utilizados para controlar las poblaciones silvestres de moscas de la fruta, sin embargo, por cuestiones ambientales y de seguridad alimentaria, son muchos los países que han ido regulando su uso; es el caso de la Unión Europea donde se ha ido prohibiendo la mayoría de ellos (Sarkar y col., 2021).

El uso de plaguicidas para controlar los insectos plaga ha contribuido sin lugar a duda al incremento global de producción de alimentos (Oerke, 2006; Oerke y col., 2012), pero esta acción ha conllevado también efectos negativos sobre la actividad y supervivencia de muchos artrópodos beneficiosos, y se ha considerado como uno de los principales factores causantes en la reducción de sus poblaciones (Desneux y col., 2007; Potts y col., 2010). Los residuos contaminantes procedentes de la aplicación intensiva de plaguicidas en algunas regiones del planeta están constituyendo también una amenaza para los recursos hídricos y edáficos en dichas áreas, generando un impacto no sólo en el medio natural y su biodiversidad (Stehle y Schulz, 2015; Silva y col., 2019), sino también en la salud humana (Sharma y col., 2020). En todo el mundo la población está expuesta a los residuos de plaguicidas que quedan en los alimentos, pero resulta más alarmante sobre todo en los países en desarrollo, donde carecen de los recursos y la experiencia para hacer cumplir la legislación sobre residuos de plaguicidas. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en su informe de 2019 sobre residuos de plaguicidas en los alimentos encontró que el 2,6% y el 7,6% de las muestras de alimentos

producidos en la UE y en terceros países respectivamente, superaban los límites máximos de residuos establecidos en la UE (EFSA, 2019).

Desde la comunidad científica se postula la reducción de plaguicidas como una de las medidas que deben ser adoptadas de inmediato para la recuperación y conservación de la biodiversidad de insectos (Harvey y col., 2020). Sin embargo, y a pesar de esa tendencia actual a la reducción de agroquímicos, el uso de pesticidas se sigue considerando una parte más en los programas de control de plagas (FAO, 2024) sobre todo para prevenir incrementos poblacionales que pueden desencadenar en daños económicos graves (Tooker y Pearsons, 2021). Dicho uso debe quedar, por tanto, restringido al paso final de las estrategias de gestión integrada de plagas, cuando las anteriores no han alcanzado los resultados requeridos.

Otra cuestión que genera alerta es el desarrollo de resistencias a los plaguicidas en la agricultura. Aproximadamente dos terceras partes de los países alrededor del mundo señalan que tienen problemas de resistencias con los pesticidas disponibles (FAO/WHO, 2018). La detección y la verificación de las resistencias en campo, así como las prácticas y estrategias que se deben llevar a cabo para prevenir y manejar la resistencia en nuevos plaguicidas o en productos ya registrados es fundamental en las políticas de intervención (FAO/WHO, 2021).

En los tefrítidos, a pesar de las fuertes exposiciones a los insecticidas, hasta los años 90 no se había encontrado una evidencia clara al desarrollo de resistencias en condiciones de campo como en otros insectos (Georghiou, 1986; Wood y Harris, 1989). Entre los factores que habían podido tener un efecto en dicha evolución de la resistencia, se citaba su alta movilidad y tendencia a una amplia dispersión espacial de sus poblaciones hacia huéspedes alternativos, escapando a la exposición continua de los químicos (Georghiou y Taylor, 1976). Sin embargo, estudios recientes indican que la presión de selección ha alcanzado el punto en que la resistencia es detectable en el campo y, por lo tanto, el control puede volverse problemático (Vontas y col., 2011).

Entre los casos de resistencia descritos en *Ceratitis capitata*, se registran varias resistencias en poblaciones de campo al malatión (Magaña y col., 2007), lambda-cihalotrín (Arouri y col., 2015), spinosad (Guillem-Amat y col., 2020) y deltametrín (Castells-Sierra y col., 2022).

En España, debido a la detección de dichas resistencias, dentro de la estrategia de control de *C. capitata* en cítricos se recomienda incluir el empleo de productos con modos de acción diferentes a los que ya se han confirmado resistencias, especialmente en las zonas donde se observe reducción de las eficacias, además de fomentar el empleo del control biológico y de los métodos culturales, siempre que sea posible dentro de una estrategia de gestión integrada. En cuanto a los dispositivos con insecticida colocados al inicio de campaña, la plaga está expuesta durante varios meses a un mismo modo de acción, por ello en los tratamientos posteriores en maduración, se recomienda usar otros modos de acción alternativos. No es el caso de las trampas de captura masiva, que presentan riesgo muy bajo en el desarrollo de resistencias (IRAC, 2024).

En la Unión Europea, las sustancias activas, protectores y sinergistas contenidos en los productos fitosanitarios empleados en la Unión Europea deben ser autorizados según establece el Reglamento (CE) nº 1107/2009 (Unión Europea, 2009a). El proceso de autorización está sujeto a una normativa muy estricta con el objetivo de garantizar un nivel elevado de protección para la salud humana y animal, y para el medio ambiente. La lista de materia aprobadas está en continua evaluación, y sus autorizaciones pueden ser renovadas o bien excluirse. Una vez aprobadas las sustancias, cada país miembro establece un registro de los formulados que autoriza para su comercialización en su territorio (Unión Europea, 2009a).

En España los productos fitosanitarios que se utilicen contra *C. capitata* deben estar inscritos en el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (Gobierno de España). De los formulados registrados, y sus correspondientes materias activas (azadiractin,

lambda cihalotrin, aceite de parafina, deltametrin, cyantraniliprol, esfenvalerato, etofenprox y spinosad), no todos ellos están autorizados para todos los cultivos (MAPA, 2024a). De la lista de formulados/materias activas registradas, la deltametrina se encuentra entre las materias activas que presentan una mayor mortalidad sobre algunos de los enemigos naturales más importantes en el control de plagas de cítricos (Tabla C1.03).

Cada vez son más los estudios de los efectos directos e indirectos de los plaguicidas sobre los enemigos naturales, y por tanto se deben revisar las actualizaciones disponibles con el fin de emplear, siempre que sea posible, aquellas materias activas más respetuosas (Beers y col., 2016; Bueno y col., 2017). Los efectos secundarios de los plaguicidas sobre los organismos beneficiosos pueden variar según el estado de desarrollo de éstos; hay estados más tolerantes y otros más sensibles, como los adultos en los parasitoides. Así pues, no sólo la elección cuidadosa del compuesto sino también el momento y la frecuencia de aplicación pueden ser clave en los esquemas del manejo integrado de plagas (Hassan, 1994).

La pulverización cebo es uno de los tratamientos más comunes y consiste en añadir al insecticida un atrayente alimenticio (proteínas hidrolizadas) que atrae a los adultos que entran en contacto con el insecticida. Dichos tratamientos se suelen realizar por parches (sólo en la cara más soleada del árbol) o bien en filas alternas cuando los frutos están más expuestos al ataque de la mosca. El insecticida más utilizado en las plantaciones de cítricos en España es el lambda cihalotrin aplicado en pulverización cebo (Castells-Sierra y col., 2023). Aunque cabe señalar al respecto, que se han descrito casos de evolución de resistencia en poblaciones de campo (IRAC, 2024).

En la Comunidad Valenciana, la Generalitat en su campaña oficial contra *C. capitata* realiza en zonas estratégicas con umbrales de plaga elevados, tratamientos colectivos terrestres y aéreos coordinados. En ambos casos se emplea la pulverización cebo. El Plan de Aplicaciones Aéreas se ejecuta de forma

Tabla C1.03 | Variabilidad de la toxicidad de materias activas empleadas contra *C. capitata*, sobre algunos de los enemigos naturales más importantes presentes en los ecosistemas cítricos en la Comunidad Valenciana. Categorías de toxicidad sobre enemigos naturales definidas por la IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control): (1) Inocuo, (2) Ligeramente tóxico, (3) Moderadamente tóxico y (4) Tóxico. Estados de desarrollo evaluados: (h) Huevo, (n) Ninfa, (l) Larva, (p) Pupa, (a) Adulto y (mix) mezcla de diferentes estados. Categorías de toxicidad sobre abejorros: (A) Cerrar la colmena antes de tratar, (B) Cerrar y sacar la colmena antes de tratar y (C) No compatible. UN: nivel desconocido, por clasificar. Elaboración propia a partir de datos obtenidos del IVIA (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 2024) y de empresas dedicadas a la producción de insectos beneficiosos para la protección de cultivos (Biobest, 2024; Koppert, 2024). *Organofosforado de amplio espectro sin autorización actual para su uso en la UE.

		Materias activas comunes empleadas contra <i>C. capitata</i>				
		Aceite de parafina	Lambda cihalotrin	Spinosad	Deltametrina	Fosmet*
Parasitoides	<i>Lysiphlebus testaceipes</i> (Hymenoptera: Braconidae)	2 _(l-p-a)	UN	3 _(a)	UN	UN
	<i>Aphytis melinus</i> (Hymenoptera: Aphelinidae)	1 _(a)	UN	3 _(a)	UN	UN
	<i>Cales noacki</i> (Hymenoptera: Aphelinidae)	3-4 _(l-p)	3 _(a)	UN	UN	UN
	<i>Anagyrus pseudococci</i> (Hymenoptera: Encyrtidae)	UN	UN	1 _(p)	UN	UN
	<i>Leptomastix dactylopii</i> (Hymenoptera: Encyrtidae)	2 _(a)	UN	3-4 _(a)	UN	UN
Depredadores	<i>Chrysoperla carnea</i> (Neuroptera: Chrysopidae)	1 _(l-a)	4 _(l-a)	1 _(l-a)	4 _(l-a)	2 _(l)
	<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	1 _(p-a) 1-2 _(l)	2 _(a)	4 _(l) 1 _(a)	4 _(l-a)	UN
	<i>Rodolia cardinalis</i> (Coleoptera: Coccinellidae)	1 _(l-p-a)	UN	2 _(l) 1 _(a)	UN	UN
	<i>Euseius stipulatus</i> (Mesostigmata: Phytoseiidae)	1 _(mix)	UN	1 _(mix)	UN	UN
	<i>Neoseiulus californicus</i> (Mesostigmata: Phytoseiidae)	2 _(mix)	3 _(mix)	1 _(mix)	4 _(mix)	1 _(n-a)
	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (Mesostigmata: Phytoseiidae)	2 _(mix)	4 _(mix)	1-2 _(mix)	4 _(h-n-a)	2 _(n-a)
Abejorros	<i>Bombus terrestris</i> (Hymenoptera: Apidae)	B	C	A	B	B

variable según los umbrales que se alcanzan en cada campaña; se realiza con avionetas y helicópteros durante el periodo de maduración de los frutos (a partir de octubre). En los últimos años se ha ido reduciendo la superficie tratada por medios aéreos (por debajo de las 50.000 ha) motivado en parte por las fuertes restricciones a la pulverización aérea de plaguicidas de la Directiva europea sobre el uso sostenible de plaguicidas (Unión Europea, 2009b).

1.2.3. Trampeo de control

Los métodos de trampeo para el control de poblaciones de *C. capitata* (trampeo masivo, trampas de atracción y muerte, y trampas quimioesterilizantes) se emplean actualmente en muchas regiones del mundo en grandes áreas y han jugado en algunas zonas un papel importante como alternativa a la aplicación de productos fitosanitarios (Martinez-Ferrer y col., 2010; Navarro-Llopis y col., 2013; Hafsi y col., 2020; Bali y col., 2021). En España en más de 50.000 ha de cítricos se emplean las trampas como método de control. El sistema de trampas más extendido es el trampeo masivo, aunque el uso de los dispositivos de atracción y muerte ha incrementado en la última década (Navarro-Llopis y col., 2013).

La captura masiva consiste en la colocación de una elevada densidad de trampas provistas de atrayentes específicos (alimenticio o sexual) con el objetivo de retener en su interior los individuos y conseguir un importante descenso de sus poblaciones. Entre los atrayentes más utilizados están las paraferomonas específicas para individuos macho como el trimedlure para especies del género *C. capitata*. Para la captura de hembras, las paraferomonas específicas no están disponibles comercialmente, y se utilizan atrayentes alimenticios a base de proteínas líquidas. Estos atrayentes, aunque atraen tanto individuos hembra como macho, tienen un sesgo hacia las hembras dado que éstas, para la formación de los huevos, tienen mayores necesidades de adquisición de proteína que los machos (Kouloussis y col., 2017). Los atrayentes sintéticos alimenticios más comunes para *C. capitata* están compuestos de acetato de amonio y trimetilamina (Navarro-Llopis y col., 2008). En cuanto modelos de trampas, hay disponibles diversas formas, tamaños y colores,

que se pueden clasificar en trampas secas, y trampas húmedas. Entre las trampas secas son muy empleadas los modelos Tephri, Easy, Maxi y Multilure que junto al atrayente seco se coloca un insecticida sólido que mata a las moscas que entran en la trampa. En trampas húmedas, como la trampa Cera, el atrayente es líquido y los individuos al entrar en la trampa mueren por ahogamiento. En España todas las trampas y atrayentes que se comercializan para la captura de moscas de la fruta deben estar recogidas en los registros del MAPA (Registro de determinados medios de defensa fitosanitarios y/o Registro de Productos Fitosanitarios).

En el método de atracción y muerte, los adultos también son atraídos a un dispositivo en el cual ya sea por ingestión o por contacto se les aplica un insecticida el cual provoca su muerte, pero en este caso, a diferencia de las trampas de captura masiva, los adultos no son retenidos en su interior. Son estructuras más fáciles de manejar y más económicas, pero tienen la desventaja que al no capturar los adultos no sirven para el seguimiento de poblaciones (Navarro-Llopis y col., 2013).

La quimioesterilización empleada para el control de *C. capitata* se basa en atraer las moscas a unos dispositivos que contienen cebo proteico con lufenuron, un inhibidor de la síntesis de quitina, que al ser ingerido por las hembras provoca atrofia en las mandíbulas de las larvas descendientes, las cuales mueren sin emerger del huevo al no poder romper el corion. Se usan con atrayentes tanto para machos (trimedlure) como para hembras (acetato amónico) porque el lufenuron puede transmitirse entre adultos, que se convierten así en vehículos del inhibidor. Aunque inicialmente no se reduce el número de picaduras de oviposición, al disminuir el porcentaje de eclosión de huevos se produce una reducción progresiva de la población (Navarro-Llopis y col., 2010).

Los factores que pueden afectar a la eficacia del trampeo como método de control son varios y se clasifican en dos grupos: aquellos que están relacionados en el tipo de trampa, los atrayentes y la densidad y disposición de éstas en campo, y aquellos factores relacionados con la extensión y asilamiento de la zona a tratar, el cultivo, el nivel poblacional de la plaga, el clima y otras técnicas

de cultivo empleadas. Un aspecto limitante del sistema del trampeo ha sido el coste de aplicación (el coste de las trampas, los atrayentes y del personal para su despliegue), siendo en algunos casos no aceptable para los productores; sin embargo con la aparición en el mercado de nuevos dispositivos más económicos y manejables, y atrayentes de eficacia más duradera, hacen posible que el trampeo masivo sea considerado como una herramienta más dentro de los programas de manejo integrado contra las moscas de la fruta (Navarro-Llopis y Vacas, 2014).

La Generalitat Valenciana, también incluye en el programa de control de *C. capitata* el trampeo de control. En 2012 incorporó el uso de trampas de atracción y muerte (principalmente MagnetTMMED) en áreas pequeñas, incrementándose la superficie cubierta hasta 12.500 ha en 2018. Desde 2019 son distribuidas a los agricultores trampas para captura masiva (Ceratipack) entre los agricultores (Castells-Sierra y col., 2023).

1.2.4. Organismos de control biológico

Aunque el uso moderno del control biológico empezó a finales del siglo XIX, ha sido a inicios del siglo XXI cuando ha experimentado un fuerte crecimiento tanto en el desarrollo de nuevos agentes biológicos como en la existencia de un mercado para dicho uso (van Lenteren y col., 2017). La Unión Europea por su parte, tal como establece en su Directiva 2009/128/CE sobre el uso sostenible de los plaguicidas ha estado defendiendo el control biológico como estrategia para la reducción y optimización del uso de fitosanitarios.

Actualmente se distinguen cuatro modalidades de control biológico: (i) el control biológico natural, donde no hay una interferencia del hombre y los organismos beneficiosos presentes en el propio ecosistema reducen las poblaciones plaga; (ii) el control biológico por conservación, en el cual se busca mejorar el rendimiento de los agentes de control biológico presentes de forma natural conservando sus recursos y reduciendo el uso de plaguicidas que inducen mortalidad sobre estos; (iii) el control biológico “clásico”, donde se introduce en una área un organismo de control biológico importado desde el área de donde la plaga es nativa; (iv) y por

último el control biológico aumentativo, el cual conlleva una cría masiva y liberación significativa de organismos (ya sean nativos o exóticos) para el control de plagas. Este control aumentativo puede ser inoculativo estacional en el que se introducen cantidades más bajas y de forma temporal (modalidad muy utilizada en invernaderos), o bien inundativo, lo cual conlleva la liberación de grandes cantidades de agentes y de forma repetida en el tiempo (Eilenberg y col., 2001; Cock y col., 2010).

Los primeros métodos de lucha biológica contra *C. capitata* datan de principios del siglo XX mediante control biológico clásico con la introducción de parasitoides en Australia y Hawái donde se consiguieron reducciones de las poblaciones de esta plaga (Clausen y col., 1965). Entre los enemigos naturales de *C. capitata*, los parasitoides de la familia Braconidae son los más utilizados en control biológico, y entre ellos *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) es la especie de mayor uso a escala mundial (Montoya y col., 2005; Paranhos y col., 2007). Se cría de forma masiva en distintos países, como es el caso de la Biofábrica de San Juan en Argentina (Suárez y col., 2019) o la de Metapa en México (Cancino y col., 2021) donde se realizan programas de sueltas aumentativas en grandes áreas.

La introducción de un enemigo natural procedente de la región en la que se origina la plaga puede contribuir a una estrategia de control adecuada, pero también puede entrañar riesgos para las especies ajenas al objetivo, los ecosistemas locales y su biodiversidad. Con el objetivo evaluar científicamente los posibles efectos no deseados en estas introducciones, organizaciones internacionales como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), a través de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (IPPC), y la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO) han desarrollado normas y orientaciones fitosanitarias internacionales sobre el uso seguro de los agentes de control (Barrat y col., 2021). La Unión Europea en este contexto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar normas que regulen y armonicen los criterios y procedimientos en materia de liberación, evaluación y circulación de agentes de control biológico entre los Estados miembros (Unión Europea, 2021).

En España el complejo natural de enemigos naturales de *C. capitata* es reducido, y aunque por sí solo no es suficiente para controlar la población y mantener los daños producidos por debajo de los umbrales tolerables, si realizan un papel importante en la disminución de poblaciones (Llorens Climet y Martín Gil, 2014).

1.2.4.1. Parasitoides

Aunque *C. capitata* ha estado presente en el área mediterránea durante mucho tiempo, en España no había registros de parasitoides autóctonos y por influencia de los éxitos en otras partes del mundo, ha habido importaciones de especies exóticas (Jacas y col., 2006; Beitia Crespo y col., 2007). La importación de los primeros parasitoides exóticos para el control biológico de *C. capitata* tuvo lugar en los años 30 y desde entonces ha habido otros intentos de introducción y aclimatación. En total varias especies de himenópteros parasitoides han sido evaluadas de forma experimental, aunque su capacidad de adaptación y nivel de parasitismo en campo no se ha conseguido determinar de una forma concluyente hasta el momento (Tabla C1.04). En la Comunidad Valenciana, se inició una búsqueda de parasitoides en los ecosistemas citrícolas y se detectó la presencia natural de dos especies parasitando *C. capitata*, *Spalangia cameroni* Perkins en 2003 y *Pachycrepoideus vindemmiae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalodae) en 2004 (Beitia Crespo y col., 2007); posteriormente en 2008 se cita por primera vez también en España el parasitoide *Aganaspis daci* Weld. (Hymenoptera: Figitidae) (Sabater-Muñoz y col., 2012). Actualmente se mantienen crías en condiciones controladas de las especies *D. longicaudata* y *A. daci* en las instalaciones del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) (Figura C1.10), y se plantea un programa de liberación aumentativo en campo en colaboración con el Servicio de Sanidad Vegetal de la Consejería de Agricultura, desarrollo Rural, Emergencia Climática y Transición Ecológica de la Generalidad Valenciana y la empresa de la empresa estatal Grupo TRAGSA (Empresa de Transformación Agraria, S.A., S.M.E., M.P. España).

Tabla C1.04 | Relación de himenópteros parasitoides importados a España para su estudio como posibles agentes de control de *C. capitata*.

Año de importación	Lugar de destino	Especie	Referencia
1930	Comunidad Valenciana	<i>Opius humilis</i> Silv. (Braconidae) <i>Diachasmimorpha tryoni</i> Cameron <i>D. fullawayi</i> Silv. (Braconidae)	Gómez-Clemente, 1932, 1934
1960	Tenerife	<i>Tetrastichus giffardianus</i> Silv. (Eulophidae)	Arozarena Doblado, 1966
2002	Comunidad Valenciana	<i>D. tryoni</i> <i>Fopius arisanus</i> Sonan (Braconidae)	Falcó Garí y col., 2003
2008	Comunidad Valenciana	<i>D. longicaudata</i>	Sabater-Muñoz y col., 2009



Figura C1.10 | Hembras del parasitoide *D. longicaudata* liberadas en campo y parasitando larvas de *C. capitata* presentes en el interior del fruto (izquierda) y unidad de oviposición en una cría masiva de *A. daci* sobre larvas irradiadas cepa Vienna-8 en laboratorio (derecha; Crédito: M. Alba).

1.2.4.2. Depredadores

Hasta el momento, los estudios que han evaluado la depredación sobre *C. capitata* y su impacto en los ecosistemas agrícolas hacen referencia a depredadores generalistas; especies de hormigas, arañas, avispas, mántidos, estafilínidos y carábidos, cuya actividad es más o menos intensa según el periodo estacional (Tabla C1.05 y Figura C1.11). El ataque se produce a diferentes estados de desarrollo; larvas, pupas o adultos recién emergidos en el suelo (Eskafi y Kolbe, 1990; Urbaneja y col., 2006; Monzó y col., 2011) o adultos en la copa de los árboles (Hendrichs y col., 1991; Kaspi, 2000; Monzó y col., 2009).

Tabla C1.05 | Especies de artrópodos depredadores citados sobre *C. capitata*.

Grupo	Familia	Especie	Referencia
Hymenoptera	Formicidae	<i>Solenopsis geminata</i> Fabricius	Eskafi y Kolbe, 1990
	Vespidae	<i>Vespula germánica</i> Fabricius	Hendrichs y col., 1991
Coleoptera	Staphylinidae	<i>Belonochus rufipennis</i> Fabricius	Silva y col., 1968
	Carabidae	<i>Pseudophonus rufipes</i>	Urbaneja y col., 2006
	Carabidae	<i>Harpalus distinguendus</i> Duftschmid	
	Carabidae	<i>Cicindela campestris</i> L.	
Dermaptera	Anisolabididae	<i>Euborellia moesta</i> Gené	
Hemiptera	Reduviidae	<i>Zelus pedestris</i> Fabricius	García y col., 2023
Mesostigmata	Macrochelidae	<i>Macrocheles roquensis</i> Mendes y Lizaso	Santos y col., 2017
Araneae	Clubionidae	<i>Chiracanthium mildei</i> L.Kosch	Kaspi, 2000
	Lycosidae	<i>Pardosa cribata</i>	Urbaneja y col., 2006; Monzó y col., 2011

Figura C1.11 | Araña saltadora (Araneae: Salticidae) depredando a un adulto de *C. capitata*. (derecha; Crédito: M. Alba).

En España son varias las especies de depredadores generalistas identificadas en cítricos, siendo los tres grupos más abundantes las hormigas, los estafilínidos y las arañas (Urbaneja y col., 2006). Entre dichas especies polífagas destaca la

actividad depredadora de la araña *Pardosa cribata* Simon (Araneae: Lycosidae), que ha sido encontrada depredando adultos y larvas de tercer estadio de *C. capitata* (Monzó y col., 2009) y el carábido *Pseudophonus rufipes* De Geer (Coleoptera: Carabidae) predando en suelo larvas de tercer estadio y pupas (Monzó y col., 2011).

1.2.4.3. Microorganismos entomopatógenos

Algunas especies de microorganismos entomopatógenos tales como los hongos *Beauveria bassiana* Bals., *Metarhizium anisopliae* Metschn., *M. brunneum* Petch. (Hypocreales: Clavicipitaceae) y la bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner han mostrado un potencial infectivo sobre larvas, pupas y/o adultos de *C. capitata* y otros tefrítidos (Dimbi y col., 2003; Konstantopoulou y Mazomenos, 2005; Quesada-Moraga y col., 2006; Cristian Vidal-Quist y col., 2010; Yousef y col., 2014). Dichos hongos entomopatógenos además de provocar la muerte del insecto se han observado también efectos secundarios sobre la reproducción y una transmisión horizontal entre individuos de la misma especie (Quesada-Moraga y col., 2008; Toledo y col., 2007; Dimbi y col., 2013). Se han realizado algunos estudios de semi-campo y campo y se ha demostrado que su actividad entomopatógena es efectiva y, por tanto, podrían ser considerados como una estrategia viable para el control de poblaciones en los programas de manejo integrado ya sea mediante aplicaciones directas o utilizando insectos vivos como vectores (Flores y col. 2013; Toledo y col. 2017; Montoya y col. 2020; Ramírez y Ramírez y col. 2022). Resultan de gran interés las aplicaciones de hongos entomopatógenos realizadas en suelo, un ambiente muy favorable para los hongos microbianos, y que van a permitir tratar las pupas, un estado de desarrollo que no suele controlarse con los tratamientos habituales por su comportamiento críptico (Yousef y col., 2017; Gava y col., 2020; Cruz-Miralles y col., 2024) (Figura C1.12).

Actualmente en España, en el Registro de Productos Fitosanitarios del MAPA se listan los formulados comerciales autorizados en España de las cuatro cepas registradas en la Unión Europea del hongo *B. bassiana*, pero sólo uno está



Figura C1.12 | Aplicación experimental en suelo de *Metarizhium brunneum* contra las fases de *C. capitata* que habitan en el suelo (izquierda) y micosis desarrollada en un adulto de *C. capitata* infectado por este hongo entomopatógeno (derecha) (Crédito: TRAGSA)

autorizado para el control de moscas de la fruta en cítricos, frutales de hueso e higueras. El formulado registrado es *Beauveria bassiana* (cepa ATCC 74040). 2,3 % (2,3 x 10E7 conidias viables/ml) [OD] P/V y la aplicación es al inicio de la infestación en pulverizaciones terrestres totales, recomendándose la repetición de las aplicaciones hasta la cosecha siempre que se vuelvan a superar los umbrales de tratamiento (MAPA, 2024a).

También ha sido estudiada la patogenicidad de algunos nematodos entomopatógenos en larvas y pupas de *C. capitata*, principalmente especies de nematodos pertenecientes a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae, y los resultados obtenidos han sido muy satisfactorios tanto a nivel de laboratorio como campo (Laborda y col., 2002; Almeida y col., 2007; Medina y col., 2008; Karagoz y col., 2009; Malan y Manrakhan, 2009; Soliman y col., 2014; Rohde y col., 2020).

Se han encontrado diferencias en cuanto a la infectividad y mortalidad relacionadas con los estados de desarrollo del huésped o las microcondiciones del suelo, y el empleo de cepas adaptadas a las condiciones locales parece

ser clave para maximizar la eficacia de las aplicaciones de estos nematodos (Campos-Herrera y Gutiérrez, 2009; James y col., 2018; Kapranas y col., 2021; Shaurub y col., 2021).

Algunos nematodos entomopatógenos ya se encuentran disponibles comercialmente en España, como varias especies del género *Steinernema* (*S. feltiae*, *S. carpocapsae* y *S. kraussei*) y *Heterorhabditis bacteriophora*. En el registro nacional aparecen como organismos de defensa fitosanitaria para el control de *C. capitata* (MAPA, 2024b), sin embargo ninguna de ellas está registrada actualmente como sustancia activa autorizada en el registro comunitario europeo como ocurre con algunos hongos entomopatógenos.

1.2.5. Manejo cultural

Son varias las técnicas o prácticas culturales que pueden utilizarse para prevenir los ataques de *C. capitata*, hacer el ambiente menos favorable para su desarrollo o disminuir sus daños. Entre ellas, se encuentra la eliminación o recogida de frutos que pueden quedar abandonados en el árbol o el suelo tras la cosecha y que actúan como reservorios para la oviposición. Otra de las recomendaciones propuestas es el control de frutales aislados que encontramos en plantaciones comerciales regulares y que suelen ser de consumo doméstico, como higueras o nísperos, los cuales, si no se controlan mediante la colocación de mosqueros u otros métodos de lucha, pueden convertirse en focos de plaga (Pla y col., 2018).

La gestión de las cubiertas vegetales o de hábitats naturales contiguos a las plantaciones también es otra práctica que cada vez está tomando más interés desde el punto de vista de la sostenibilidad en los sistemas agrícolas (Arenas y col., 2015; Wijnands y col., 2016). Para el control biológico por conservación, el manejo de las cubiertas vegetales supone un reservorio para el mantenimiento de las poblaciones de enemigos naturales (Holland y col., 2016; Mockford y col., 2019).

1.2.6. Técnica del Insecto Estéril (TIE)

La técnica del insecto estéril consiste en la liberación en grandes cantidades de insectos estériles en el seno de una población natural de la misma especie plaga con el objetivo de reducir el acoplamiento entre los nativos e introducir esterilidad en la población. El acoplamiento con un insecto estéril da lugar a una descendencia no viable, lo cual se traduce al cabo de varias generaciones en una reducción de la población natural nativa.

El primer programa TIE aplicado con éxito se inició en los años 1950s en Estados Unidos. contra el gusano barredor del ganado *Cochliomyia hominivorax* Coquerel (Diptera: Calliphoridae), una especie cuya larva es parásito obligado de vertebrados de sangre caliente. Desde entonces y en diferentes continentes, varios programas de control de plagas han integrado esta técnica para la erradicación o reducción de especies como las moscas tsetse *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae), el gusano rosado del algodón *Pectinophora gossypiella* Saund. (Lepidoptera: Gelechiidae), la polilla del manzabo *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), la mosca de la cebolla *Delia antiqua* Meigen (Diptera: Anthomyiidae), el gorgojo del algodón *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae), la lagarta peluda *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Erebidae) entre otras. Actualmente la TIE es considerada como un método de control biológico y se encuentra entre los primeros diseñados para la aplicación en grandes áreas contra especies de tefritidos, entre ellas especies del género *Anastrepha* y *Bactrocera*. El primer programa a gran escala se estableció en la década de 1970 y detuvo la invasión de *C. capitata* desde Centroamérica hacia el sur de México (Vreysen y col., 2007; Dyck y col., 2021).

Esta técnica implica la producción en masa de individuos de la especie plaga objetivo y su esterilización reproductiva. Dicha esterilidad es inducida habitualmente por exposición a radiación ionizante, la cual causa daños cromosómicos permanentes en las células germinales que impiden el desarrollo completo del embrión. La radiación gamma de fuentes isotópicas (principalmente Cobalto-60) es la que se aplica comúnmente, pero existen otras opciones de

irradiación como los electrones de alta energía (radiación beta) y los rayos X (Bakri y col., 2021). Existen otros métodos alternativos a la radiación como la esterilización química, la incompatibilidad citoplasmática basada en simbioses (IC) y la incorporación de genes condicionalmente letales, aunque estos métodos aún siguen en fase de desarrollo y presentan ciertas limitaciones en su aplicación por las regulaciones que presentan algunos países en cuanto a la tecnología transgénica o posibles efectos mutagénicos (Lance y McInnis, 2021).

Los programas TIE de aplicación en grandes áreas requieren de plantas de producción masiva que puedan producir millones de insectos a la semana. Estos insectos, una vez esterilizados, son distribuidos y liberados por el territorio mediante sistemas de liberación terrestre y aérea. La liberación aérea, especialmente con aviones, es más sensible a las condiciones meteorológicas, sin embargo, resulta muy interesante para cubrir con rapidez grandes áreas, especialmente aquellas que debido a su orografía o falta de infraestructuras presentan dificultades de accesibilidad por vía terrestre. Además, con la incorporación del Sistema de Posicionamiento Global (GPS) y de equipos de liberación que pueden variar las densidades de suelta, los programas de liberación actuales establecen trayectorias controladas que permitan distribuir los insectos estériles sobre el área a tratar según las necesidades del momento (Dowell y col., 2021).

Otro de los avances que posibilita mejorar la efectividad y viabilidad económica de los programas TIE es la utilización de nuevas cepas para la producción en masa. Es el caso de las cepas de sexado genético (*genetic sexing strains*- GSS), que permiten eliminar las hembras en el proceso de producción y liberar así solo machos estériles. Estas cepas han sido desarrolladas para varias especies de mosquito y tefrítidos, concretamente para *C. capitata* actualmente está disponible la GSS Vienna-8. Esta cepa fue desarrollada en el laboratorio de Control de Plagas de Insectos del Centro Conjunto FAO/IAEA, y se ha demostrado estable a nivel de cría a gran escala durante periodos prolongados de tiempo. La cepa GSS Vienna-8 lleva dos marcadores seleccionables (mutaciones), el gen letal

sensible a la temperatura (*thermal sensitive lethal- tsl*), que permite mediante un tratamiento térmico de los huevos eliminar los embriones femeninos, y el gen de pupas blancas, que se emplea como un marcador visible ya que las larvas que dan lugar a hembras forman una pupa blanca (Augustinos y col., 2017).

Las opciones estratégicas que pueden perseguirse en los programas que integran la TIE son varias en función de los objetivos del propio programa y del estado de la plaga en el área de interés. Se agrupan principalmente en cuatro opciones: (1) erradicación: eliminar de un área la plaga establecida o un brote de la plaga introducida para establecer áreas libres de esta plaga, (2) supresión: reducir las poblaciones de plaga para establecer áreas de baja prevalencia de plaga, (3) contención: aplicar medidas fitosanitarias y reglamentarias en un área infestada y su alrededor para prevenir la propagación de la plaga, (4) prevención: aplicar medidas fitosanitarias y reglamentarias para prevenir la introducción o reintroducción de una plaga en un área libre de plagas, si bien es posible también una combinación de ellas (FAO 2017; Hendrichs y col., 2021b).

Aunque estas estrategias pueden proporcionar los mismos tipos de beneficios directos e indirectos, en términos de insumos necesarios, retornos económicos e impacto posterior, pueden existir marcadas diferencias. Así pues, en áreas con alto riesgo de introducción, la estrategia más rentable de utilizar es la prevención; proteger proactivamente una zona libre de plagas siempre es mucho más rentable que tener que “convivir con” o erradicarla (Enkerlin, 2021).

1.2.6.1. Programas TIE internacionales contra *Ceratitis capitata*

El primer gran programa TIE implementado para el control de *C. capitata* se inició en México en 1979, fruto de una cooperación entre Estado Unidos., México y Guatemala (Hendrichs y col., 1983). Desde entonces, varios países integran el uso del TIE en sus programas contra *C. capitata* (Tabla C1.06). Algunos, como en Estados Unidos, Guatemala, México, Perú, Argentina, Republica Dominicana y Chile, tienen como objetivo la contención o erradicación local de poblaciones

Tabla C1.06 | Programas internacionales de manejo integrado de plagas que integran la TIE contra *C. capitata* en grandes áreas, agrupados por opciones estratégicas principales (prevención, contingencia, erradicación o supresión) (Enkerlin, 2021). *Cabe señalar con respecto al programa de California (USA), que debido a brotes aislados detectados algunos años, dicho programa se estableció como de exclusión-prevención (Hendrichs y col, 2021b).

Estrategia	Programa	
Prevención	Mediterranean Fruit Fly Preventive Release Programme (Los Angeles, Basin, California, USA)	1996 – presente
	Mediterranean Fruit Fly Preventive Release Programme (Tampa-Palm Beach-Miami, Florida, USA)	1980s – presente
	National Fruit Fly Control Programme (Chile)	1996 – presente
Contingencia	Mediterranean Fruit Fly Programme “Programa Moscamed” (Guatemala, Mexico, USA)	1983 – presente
	Binational Chile-Peru Programme for Mediterranean Fruit Fly Eradication	1996 – presente
Erradicación	Mediterranean Fruit Fly Programme “Programa Moscamed” (Guatemala, Mexico, USA)	1978 – 1982
	National Mediterranean Fruit Fly Programme (Chile)	1990 – 1995
	Mediterranean Fruit Fly SIT Control Programme (Southern Australia)	1980s – presente
	Mediterranean Fruit Fly Eradication Programme “PROCEM” (Mendoza – Patagonia, Argentina)	1992 – present
	Mediterranean Fruit Fly Eradication Programme (Altagracia, Dominican Republic)	2015 – 2017
Supresión	Mediterranean Fruit Fly Suppression Programme (Arava, Israel), Mediterranean	1994 – presente
	Mediterranean Fruit Fly Suppression Programme (South Africa)	1997 – presente
	Mediterranean Fruit Fly Area-Wide Integrated Pest Management Program (Hawaii)	1960s – presente
	Mediterranean Fruit Fly Suppression Programme “Programa Madeira-Med” (Portugal),	1998 – 2008
	Mediterranean Fruit Fly Suppression Programme (Israel/ Jordan),	1994 – presente
	Mediterranean Fruit Fly SIT Control Programme (Peru)	1970s – presente
	National Fruit Fly Campaign (Central and Southern Mexico)	1991 – presente
	Mediterranean Fruit Fly Suppression (Tunisia)	2001 – 2007
	Mediterranean Fruit Fly Suppression Programme (Valencia, Spain)	2005 – presente
	Mediterranean Fruit Fly Suppression Programme (Neretva Valley, Croatia)	2009 -- presente
Mediterranean Fruit Fly Suppression Programme (Agadir, Morocco)	2010 -- presente	

(Enkerlin, 2021). Otros como Israel (Rossler y col., 2000), Sudáfrica (Venter y col., 2021), España (Plá y col., 2021) o Croacia (Bjeliš y col., 2016), presentan un enfoque dirigido a la supresión de poblaciones.

En España, entre la década de los años 60 y 70, se llevaron a cabo estudios preliminares a pequeña escala con la técnica TIE en diversas localizaciones: Tenerife (1966), Murcia (1969); Granada (1971-1973) y La Isla de El Hierro (1974) (Mellado y col., 1974). Sin embargo, no fue hasta 2003 cuando se aplicaría un proyecto piloto a mayor escala en la Comunidad Valenciana (Primo-Millo y col., 2003).

1.2.6.2. Programa TIE en la Comunidad Valenciana

En la Comunidad Valenciana, en el año 2003, con el objetivo de reducir los tratamientos aéreos con insecticidas que se realizaban durante la campaña anual para el control de *C. capitata*, se empezó a trabajar con la TIE (Primo-Millo y col., 2003). Con la financiación de la Conselleria de Agricultura de la Comunidad Valenciana y de la Agencia Internacional de la Energía Atómica (IAEA), y el trabajo conjunto del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), del Consejo Superior de Investigaciones Agrarias (CSIC) y de la empresa estatal Grupo TRAGSA, se inició un programa piloto a partir de pupas de machos estériles importadas desde la biofábrica de Mendoza (Argentina) (Argilés y col., 2007). Aunque el programa TIE de Madeira (Portugal) aún estaba activo cuando se inició el programa en la Comunidad Valenciana, se realizaron las importaciones desde Argentina. Esto se debió a que la IAEA, que asesora y coordina este tipo de proyectos, recomendó no utilizar la cepa de Madeira ya que por problemas de compatibilidad con la cepa Vienna-8 (que es la utilizada a nivel internacional) la biofábrica en Madeira tuvo que desarrollar su propia cepa de moscas. Así pues, se decidió importar las pupas de Argentina, aunque ello implicara un incremento de los costes.

Las pupas estériles recibidas semanalmente desde Argentina se dejaban evolucionar, y una vez los adultos alcanzaban la madurez sexual, se liberaban en campo en diferentes zonas cítricas de la Comunidad Valenciana. La puesta a

punto del programa supuso también explorar aspectos clave como la evaluación de sistemas de emergencia de adultos en producción masiva, la implementación de controles de calidad o el desarrollo de maquinaria para la liberación terrestre y aérea (Argilés y col., 2007).

En 2005, la Conselleria de Agricultura de la Comunidad Valenciana apuesta por ampliar el uso de la TIE en su territorio, y se inicia la construcción de una Bioplanta de Insectos Estériles en Caudete de las Fuentes (Valencia, España). El diseño y la construcción de la bioplanta se llevó a cabo por la empresa TRAGSA con el apoyo del Centro Conjunto FAO/IAEA. Esta bioplanta, con una capacidad de producción de 500 millones de pupas estériles la semana, se hace operativa en 2007 permitiendo el uso de la TIE dentro del programa de manejo integrado para la gestión de *C. capitata* en grandes áreas de la Comunidad Valenciana (Plá y col., 2021) (Figura C1.13). Actualmente la Bioplanta de Caudete de Las Fuentes se encuentra entre las biofábricas con mayor capacidad de producción de machos estériles de *C. capitata* junto con la de El Pino (El Cernal, Barberena, Guatemala) y Tapachula (Chiapas, México) (comunicación personal I. Pla, 08.05.2024).



Figura C1.13 | Bioplanta de Insectos Estériles de la Generalitat Valenciana situada en Caudete de las Fuentes (Valencia). Instalaciones para la producción de pupas de machos estériles *C. capitata* cepa Vienna-8 (Crédito: TRAGSA).



Figura C1.14 | Sala con las colonias de amplificación para la producción de huevos (izquierda) y sala de colecta larval donde las larvas abandonan la dieta larval y saltan al sustrato de pupación (derecha) (Crédito: TRAGSA).

Desde 2015, la cepa que se emplea para producir de forma masiva las pupas de machos estériles en la bioplanta de Caudete de las Fuentes es la cepa Vienna-8 GSS-Valencia. Esta cepa, que mantiene los marcadores genéticos originales de la cepa Vienna-8, se obtuvo por cruzamiento de ésta con individuos silvestres procedentes de poblaciones de campo locales (Comunidad Valenciana). Las pupas producidas se marcan con un pigmento fluorescente (RadGlo JST 17, Radiant Color, Bélgica), el cual permite la posterior identificación en el laboratorio de adultos atrapados en las trampas de la red de monitoreo instaladas en campo (**Figura C1.15**). Las pupas que darán lugar a machos se esterilizan mediante exposición a 100 Gy con un acelerador de haz de electrones de onda continua (RHODOTRON® TT200–Ion Beam Applications S.A.).

Después de la esterilización, las pupas son transportadas al centro de empaque y liberación localizado en las instalaciones del IVIA (Moncada, Valencia) en condiciones controladas de temperatura (18-22°C) y en unos contenedores especiales que mantienen un nivel de oxígeno muy bajo. Allí tiene lugar la emergencia de los machos estériles, los cuales son preparados para ser liberados en campo al alcanzar la madurez sexual mediante un tratamiento con aromaterapia realizado el día antes de su liberación. Dicho tratamiento, a base de aceite de raíz de jengibre con un 40% de zingibreno (0,5ml/m) durante 6 horas, consigue incrementar el rendimiento de apareamiento tras su liberación (Shelly y col.,



Figura C1.15 | Macho estéril Vienna-8 recién emergido con el *ptilinum* aún visible y trazas del pigmento transferido durante la rotura del pupario (izquierda). Identificación bajo luz ultravioleta de los machos estériles recapturados en las trampas de la red de monitorización de la Comunidad Valenciana.

2006; Juan-Blasco y col., 2013b). Para facilitar su manejo y evitar daños hasta su liberación, los machos estériles son expuestos a bajas temperaturas (2°C) durante 30 min, lo permite introducirlos en la máquina de liberación, que presenta un sistema de enfriamiento y ventilación que permite evitar el sobrecalentamiento y la condensación de los insectos durante el proceso (Plá y col., 2021). La máquina de liberación se carga en la aeronave, la cual suelta los machos estériles a medida que avanza el vuelo por una ruta previamente definida mediante un sistema de posicionamiento global diferencial (*Differential Global Positioning System-DGPS*). La dosis de liberación se ajusta diariamente según el área sobrevolada y se determinada en base a un mapa de riesgo que se obtiene de combinar la información de la densidad de la población salvaje, obtenida a partir de la red de monitoreo, y la presencia de variedades de cítricos más susceptibles en las zonas TIE fijadas en las tres provincias (Castellón, Valencia y Alicante) (Plá y col., 2021).

Todo el proceso está en consonancia con las directrices establecidas por el Centro Conjunto FAO/IAEA para este tipo de programas en grandes áreas. Desde la producción de huevos hasta la liberación de los adultos en la aeronave se sigue un control de calidad según el procedimiento establecido en el manual internacional de la FAO/IAEA/USDA (2019).

1.3. Biología reproductiva de *Ceratitis capitata*

1.3.1. El sistema reproductivo

Los primeros estudios que se publican sobre el sistema reproductivo de *C. capitata* se sitúan en la primera mitad del siglo XX (Costantino, 1930; Hanna, 1938; Ruiz-Castro, 1945). A partir de los trabajos de Knipling (1955) sobre el uso de machos estériles para el control de insectos dañinos, se empieza a estudiar más específicamente este tema (Causse, 1972; McAlpine, 1981; Marchini, 1982; López Munguira y col., 1983; Valdez-Carrasco y Prado-Beltran, 1990; Dallai y col., 1993; de Carlo y col., 1994). Más recientemente, y en base a dichos trabajos, se aporta nuevos detalles sobre la estructura organizativa de su sistema reproductivo, tanto del masculino como del femenino (Marchini y col., 2001a, 2003; Marchini y Bene, 2006).

1.3.1.1. Anatomía del sistema reproductivo en las hembras.

Las funciones principales del sistema reproductor de la hembra son producir ovocitos maduros y viables; recibir y almacenar los espermatozoides transferidos por los machos durante la cópula; asegurar la unión de los ovocitos y los espermatozoides para lograr la fecundación; y proporcionar los nutrientes adecuados para la eclosión y posterior desarrollo de las larvas.

La hembra dispone internamente de un par de ovarios, donde se localizan las células germinales que van a dar lugar a los ovocitos, un oviducto lateral corto por donde descienden los ovocitos maduros y que une cada ovario con un oviducto común que desemboca en el canal vaginal. En la vagina se distinguen dos partes, una anterior abultada (*bursa copulatrix*) en la cual se ubica la cámara de fertilización (también conocida como cámara anterior o receptáculo ventral) y donde desembocan también los conductos de las glándulas accesorias y los de las espermatecas; y una posterior alargada que conecta con en el oviscapto. Las glándulas accesorias producen secreciones que favorecen la lubricación de los huevos o la activación de los espermatozoides.

El género *Ceratitis* presenta dos espermatecas las cuales funcionan como receptáculos encargados de recibir, mantener y liberar los espermatozoides para fertilizar los ovocitos. Son órganos quitinizados de color marrón oscuro-negro, de forma piriforme con la parte distal redondeada, de una longitud aproximada de 160 μm , envueltas de un tejido adiposo y unidas a un conducto que tiene aproximadamente 0,9 mm de longitud (Figura C1.16).



Figura C1.16 | Sistema reproductivo de una hembra de *C. capitata* de 12 días de edad obtenida de Aguilar y col. (2003) (izquierda) y espermatecas aisladas junto a un fragmento del conducto espermatográfico (derecha).

La parte externa del aparato reproductor femenino (terminalia) se corresponde a los últimos segmentos abdominales (7^o, 8^o y 9^o). En estado de reposo, el segmento 8^o y el 9^o se alojan en el interior del 7^o, mientras que durante la cópula o la oviposición se produce la evaginación de estos dos segmentos que constituyen el oviscapto (aculeus), una estructura altamente esclerotizada que sirve para perforar el sustrato de oviposición y depositar los huevos.

1.3.1.2. Anatomía del sistema reproductivo en los machos.

Para que el desarrollo de los ovocitos que produce la hembra continúe es necesario que el macho suministre el esperma para fertilizarlos; sólo después de fusionarse un espermatozoide con un ovocito, se producirá un óvulo y posteriormente un cigoto.

El sistema reproductivo masculino se estructura en un par de testículos, dos conductos deferentes que están conectados al extremo basal de los testículos y varios pares de glándulas accesorias tubulares. Los testículos se identifican fácilmente por su forma piriforme y su pigmentación amarilla que se vuelve más intensa con la edad (Figura C1.17). Tanto los conductos deferentes como las glándulas accesorias desembocan en una gran cámara común de la cual parte un largo conducto eyaculador. Éste, en su tramo final, está conectado a un órgano de erección y bombeo (apodema eyaculador) el cual por medio de contracciones musculares genera una presión que empuja el líquido seminal, que contiene los espermatozoides maduros, hacia el extremo terminal del conducto eyaculador. Unido a la última sección de este conducto eyaculador se encuentra el edeago, un delgado tubo esclerotizado que, junto con otras estructuras de la terminalia del macho, forma la mayor parte del órgano intromitente que está adaptado anatómica y fisiológicamente para la cópula y la transferencia de esperma a las hembras.

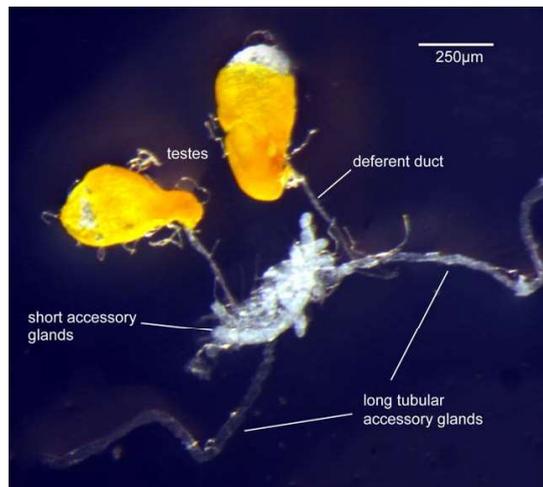


Figura C1.17 | Sistema reproductivo masculino de *C. capitata* obtenida de Scolari y col. (2012).

1.3.2. Espermatogénesis.

La espermatogénesis en los testículos de *C. capitata* es similar a la descrita en otros dípteros (Anwar y col., 1971; Williamson, 1989; Martínez

y col., 1995; Martínez y Hernández-Ortiz, 1997). El origen de la formación de los espermatozoides tiene lugar en el extremo apical de los testículos donde se encuentran las células germinales o espermatogonias. A partir de éstas y por divisiones meióticas sucesivas derivan los espermatoцитos, y de éstos las espermátidas; este conjunto de células se encuentra en la región intermedia de cada testículo. Después de un proceso complejo de diferenciación celular (Báo y col., 1989; Báo y Dolder, 1990), las espermátidas dan lugar a los espermatozoides. Éstos se encuentran primero estrechamente unidos formando haces o paquetes, y posteriormente, al madurar, quedan libres en grandes cantidades en la última zona de la parte basal de los testículos (Figura C1.18).

Los espermatozoides tienen forma filamentosa; la cabeza es esbelta y a primera vista apenas se distingue de la cola, ya que ambas presentan una amplitud similar (Figura C1.19). La larga cola se identifica por su menor rigidez y apariencia ondulante. La longitud de la cabeza puede variar entre los 25-33 μ m, y en algunos estudios se describen diferencias según el origen, siendo más largas en los espermatozoides procedentes de machos salvajes procedentes de campo y en las primeras generaciones de individuos domesticados (McInnis, 1993; McInnis y col., 1994).

1.3.3. Apareamiento y transferencia de esperma

El comportamiento de apareamiento que muestra *C. capitata* es semejante al observado en otros tefrítidos polívoros de frutos y se describe como “sistema en leks” (Sivinski y Burk, 1989). En este sistema los machos se mantienen en un área defendiéndola y compitiendo con otros machos, y las hembras son las que eligen de forma activa al macho con el que quieren reproducirse. Aunque este apareamiento en leks parece ser el más frecuente, el apareamiento en solitario también ha sido observado en la naturaleza (Hendrichs y Hendrichs, 1990; Whittier y col., 1994). Según las experiencias reportadas el número de machos por lek puede variar entre los 3 y 16 (Prokopy y Hendrichs, 1979; Baker y van der Valk, 1992; Shelly y Whittier, 1996; Whittier y col., 1994).

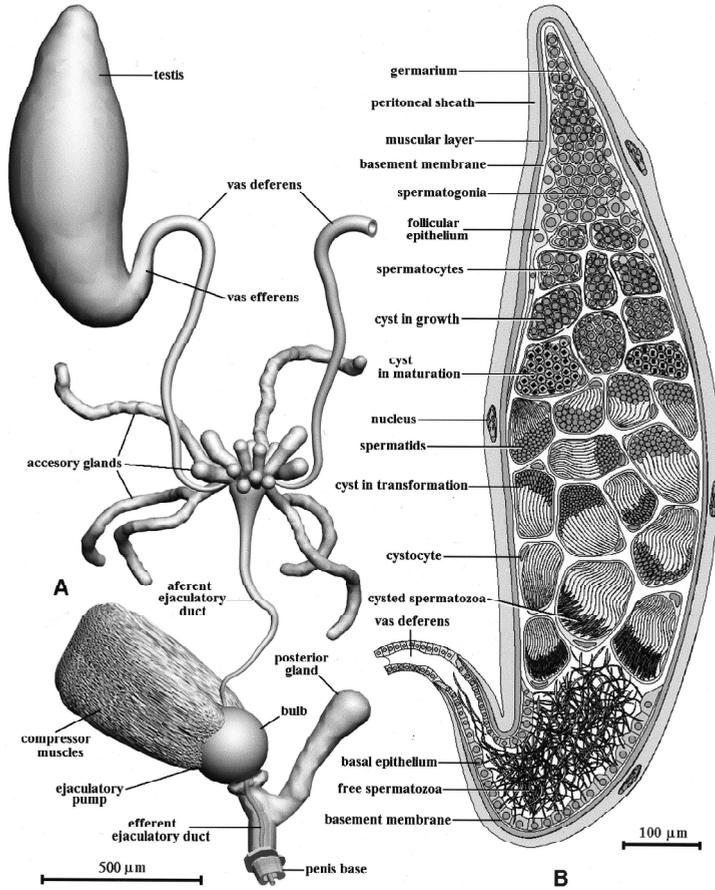


Figura C1.18 | Órganos reproductivos de *Anastrepha ludens* análogos a los de *C. capitata*. Modelo 3D del sistema reproductivo interno (A) y diagrama de un corte longitudinal de un testículo (B). Obtenida de Valdez (2001).

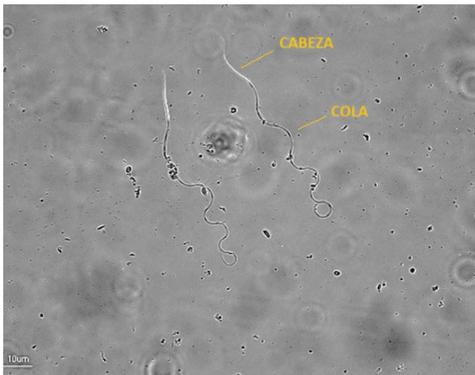


Figura C1.19 | Espermatozoides maduros de *C. capitata*, teñidos con el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) fotografiados con luz visible (izquierda) y bajo luz ultravioleta donde sólo son perceptibles las cabezas (400x) (derecha).

El proceso de cortejo se inicia con el vuelo de los machos hacia los árboles; una vez establecidos en él, cada uno defiende una pequeña área en una hoja donde liberan feromonas y producen señales visuales y acústicas por vibraciones en las alas para atraer a las hembras. Antes de la llegada de la hembra, el macho se encuentra en estado de excitación, permanece estático, con todo su cuerpo levantado sobre sus piernas; el abdomen está fuertemente retraído en la parte posterior e inflado lateralmente. El extremo final del abdomen se encuentra elevado y aparece una ampolla anal inflada brillando como una gota de líquido. Desde esta ampolla se emiten las feromonas sexuales que son segregadas por unas glándulas asociadas a las paredes del recto (Figura C1.20). Estas feromonas que emiten los machos juegan un papel importante en la atracción de las hembras y de otros machos a la zona de *leks*.



Figura C1.20 | Ampolla anal que proyectan los machos para liberar feromonas sexuales durante el proceso de cortejo (izquierda) y macho con el edeago ya insertado e inicio de la cópula (derecha; Crédito: T. Sánchez).

Las hembras receptivas vuelan al agregado individualmente; cada hembra se posa cerca de un macho y camina hacia él. El comportamiento del macho no cambia, permanece inmóvil hasta que la hembra entra en su campo visual, a una distancia de unos pocos centímetros, momento en que el macho descende la ampolla anal por debajo del abdomen, empieza una rápida vibración de las alas y se acerca a la hembra. Cuando las cabezas de ambos están muy cerca, la excitación del macho incrementa, produce un movimiento de las alas hacia delante acompañado de una

rápida rotación de la cabeza, a continuación, salta sobre la cabeza de la hembra y alcanza el extremo de su abdomen. El macho se da la vuelta y con sus patas y unos cierres presentes en su terminalia (surstilos) sujeta el oviscapto de la hembra e inicia la cópula (Feron, 1962; Prokopy y Hendrichs, 1979; Arita y Kaneshiro, 1989; Whittier y col., 1992; Briceño y Eberhard, 1998; Eberhard, 2000) (Figura C1.20).

Para que la intromisión del edeago sea efectiva, el ovipositor de la hembra debe permanecer extendido. Una vez consigue introducirlo a través del tracto reproductivo de la hembra, tiene lugar la inseminación. El edeago del macho llega hasta a la bursa copulatrix donde transfiere el fluido seminal a la hembra; los espermatozoides permanecen allí un breve periodo de tiempo hasta que se dirige hacia los conductos de las espermatecas donde van a quedar almacenados (Eberhard y Pereira, 1995; Marchini y col., 2001a). Dentro de las espermatecas, las sustancias presentes en el fluido espermático y las secreciones de la glándula espermatecal nutren a los espermatozoides, proporcionando un ambiente apropiado que asegura la viabilidad a largo plazo de los espermatozoides (Pascini y Martins, 2017).

Las hembras de *C. capitata*, como en otras especies de su familia, presentan dos órganos funcionales de almacenamiento de esperma: las espermatecas, que son utilizadas por las hembras para el almacenamiento a largo plazo del esperma después de la cópula, y la cámara de fertilización con una función de almacenamiento a corto plazo previo a la fertilización de los huevos (Marchini y col., 2001a; Twig y Yuval, 2005). La probabilidad de encontrar esperma en la cámara de fertilización después del apareamiento es alta (López-Muñoz y col., 2018) pero la proporción de esperma almacenado en ella puede variar según las especies. Por ejemplo, en *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae) estima que el receptáculo ventral se almacena solo un 3% del esperma total (Perez-Staples y col., 2007), en *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) aproximadamente un 10% (Abraham y col., 2011a), en *A. suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae) un 37% (Fritz, 2004) mientras que en *A. obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) podría llegar al 50% (Perez-Staples y Aluja, 2006). En el caso de *C. capitata*, la cantidad de esperma

almacenado en la cámara de fertilización se considera que puede representar menos del 20% de la cantidad total de esperma almacenado (cámara de fertilización y espermatecas) (Twig y Yuval, 2005; Bertin y col., 2010).

El almacenamiento de esperma entre las espermatecas no se produce de forma arbitraria entre ellas. Tanto en *C. capitata* como en otros tefritidos, se han observado unos patrones de asimetría en cuanto a la cantidad de esperma almacenado que han sido relacionados con la capacidad de almacenamiento de estos órganos. El esperma se almacena de forma independiente en las espermatecas; primero tiende a transferirse a una de ellas hasta que se acerca a su límite de capacidad y entonces pasa a desviarse hacia el otro órgano que permanecía más vacío (Yuval y col., 1996; Taylor y col., 2001, 2000; Fritz, 2004; Harmer y col., 2006; Perez-Staples y col., 2007; Shadmany y col., 2021). Esta asimetría en la distribución de esperma entre las espermatecas se ha interpretado en algunas especies de dípteros como una estrategia biológica que permite aislar el esperma procedente de diferentes machos y emplearlo como instrumento de elección para la paternidad de su descendencia después de una inseminación múltiple (Saul y col., 1988; Tsubaki y Yamagishi, 1991; Ward, 1993; Otronen, 1997; Fernández Goya y col., 2019; Simmons, 2019; Ward, 2000; Abraham y col., 2023).

1.3.4. Esterilidad inducida por radiación

La esterilidad de los insectos liberados en los programas TIE se induce principalmente al ser expuestos a haces de electrones, radiación X o radiación gamma. La radiación gamma y el isótopo radiactivo Co-60 como fuente de irradiación es el tratamiento más comúnmente empleando para la esterilización (Dyck y col., 2021). Cuando las células germinales son expuestas a una irradiación ionizante se induce una ruptura cromosómica, una lesión primaria que conduce a mutaciones letales dominantes (MLD) en los gametos. Estas MLD, con que estén presentes en uno de los dos gametos, generan una inestabilidad cromosómica durante la formación del cigoto que desemboca en la muerte de éste (Muller, 1927, 1954).

Los mecanismos por los cuales estas MLD causan la letalidad en el cigoto han sido bien documentados en los dípteros (LaChance, 1967; Smith y Von Borstel, 1972). En los machos irradiados, esa ruptura en el cromosoma no afecta a la maduración del espermatozoide ni a éste hasta que entra en un óvulo. Después de la fusión comienzan las divisiones nucleares; durante la profase temprana, el cromosoma roto experimenta una replicación normal, pero durante la metafase, los extremos rotos pueden fusionarse y dar lugar a la formación de un cromosoma dicéntrico y un fragmento acéntrico. El fragmento acéntrico se pierde con frecuencia, mientras que el fragmento dicéntrico forma un puente en la anafase que conduce a otra ruptura cromosómica. Todo este proceso luego se repite, dando lugar a la acumulación de graves desequilibrios en la información genética de las células hijas. Si se rompen dos cromosomas diferentes, también se producen los mismos problemas para las células en división que los formados por una rotura en un solo cromosoma, al sufrir una fusión incorrecta y dar lugar al ciclo rotura-fusión-puente (McClintock, 1941). La acumulación de ese desequilibrio genético da lugar a la muerte del cigoto, normalmente en las primeras fases de división celular, y por tanto una descendencia no viable. Una fuente de información muy completa sobre los efectos de la radiación en los principales grupos de insectos es la base de datos internacional sobre desinfección y esterilización de insectos IDIDAS (IAEA, 2024a). Las células somáticas son más radiorresistentes que las células germinales, y por ello las dosis letales de radiación deben ser más altas que las dosis esterilizantes, no obstante, la irradiación genera un estrés oxidativo que puede afectar a otros componentes celulares como proteínas y lípidos (Arthur y col., 2015; Bakri y col., 2021).

La espermatogénesis en los tefrítidos está muy avanzada en su último estadio pupal; las espermátidas y espermatozoides ya están diferenciados y es en ese momento cuando suele llevarse a cabo la irradiación (Hooper, 1989). En los programas de producción masiva de machos de *C. capitata*, actualmente la radiación se aplica en su etapa pupal tardía (uno o dos días antes de la emergencia

del adulto) y en condiciones de hipoxia, a unas dosis que oscilan entre 80 y 150 Gy, las cuales producen una esterilidad entre el 97 y 100% (IAEA, 2024b).

La esterilización por irradiación daña los espermatoцитos primarios junto con las espermatogonias primarias y secundarias, pero sobreviven las espermátidas y los espermatozoides (Muller, 1927, 1954; Proverbs, 1968; Teruya y col., 1985). En el proceso de esterilización es clave establecer una dosis de irradiación adecuada que cause un nivel de esterilidad que atrofe los tejidos germinales e impidan la recuperación de la fertilidad, pero sin causar efectos perjudiciales como la aspermia o daños somáticos que supongan un deterioro físico que se traduzca en una menor emergencia, supervivencia en los adultos o pérdida de competitividad sexual. La especie, el sexo, el estado de desarrollo, la temperatura o la atmósfera en que tiene lugar la exposición a la radiación son algunos de los parámetros a tener en cuenta para establecer las dosis de irradiación en los programas de liberación de insectos estériles (Hooper, 1989; Robinson, 2021).

1.4. Justificación y objetivos

Conocer la biología reproductiva de una especie plaga es de gran importancia para el desarrollo de sus métodos de control, y desentrañar aspectos que pueden mejorar su conocimiento abre oportunidades para desarrollar nuevos enfoques en sus programas de manejo integrado.

Debido al papel central de los espermatozoides en la reproducción, una parte importante de la investigación en el campo de la biología reproductiva se ha dedicado al estudio de la producción y transferencia del esperma, lo cual requiere a menudo una cuantificación precisa y eficiente de éstos.

Los tefritidos han sido objeto de una amplia investigación en este campo, en parte debido al desarrollo de técnicas de insectos estériles (TIE) para el manejo de algunas especies económicamente muy dañinas. La eficacia de estas técnicas depende en gran medida de la transferencia de esperma por parte

de los machos estériles liberados, quienes deben localizar, atraer, cortejar y copular con las hembras silvestres, así como inseminarlas efectivamente.

Además del estudio de la producción y la transferencia de esperma, también cobra importancia el hecho que las hembras tienen órganos especializados para el almacenamiento de esperma y, por tanto, el éxito reproductivo también está relacionado con la cantidad del esperma que almacenan durante la cópula y cómo se utiliza ese esperma.

La fluorometría, la espectrofotometría de absorbancia, la citometría de flujo o el conteo directo bajo microscopio son algunas de las técnicas que han sido empleadas para la cuantificación de los espermatozoides en insectos. El método más comúnmente utilizado en muchos taxones ha sido el conteo directo al microscopio, como es el caso de *Ceratitis capitata*. Esta cuantificación visual directa, aunque puede resultar económica y sencilla, el proceso de preparación resulta tedioso y lento. Otras de las limitaciones de estos métodos ha sido la dificultad de realizar un conteo preciso debido a la presencia de glomérulos de espermatozoides o a la imposibilidad de extraer completamente el esperma de los órganos de almacenamiento.

La revolución biotecnológica ha introducido técnicas moleculares avanzadas que pueden superar las barreras inherentes a los enfoques tradicionales en lo que respecta a la detección y cuantificación precisa de espermatozoides. Este avance puede ser crucial para dilucidar algunos mecanismos detrás de la transferencia y almacenamiento de esperma, así como para comprender las dinámicas de la recópula y la poliandria en el éxito reproductivo. Además, tiene el potencial de optimizar las estrategias de manejo de plagas, particularmente a través de la TIE, al proporcionar información valiosa sobre la eficacia reproductiva y la competencia de los machos estériles en condiciones naturales.

Desde esta perspectiva y ante la necesidad de profundizar en la comprensión de la biología reproductiva de *C. capitata*, y cómo este conocimiento puede transformar y mejorar los métodos de control poblacional existentes se desarrollan los capítulos de esta tesis doctoral cuyos objetivos específicos son los siguientes:

- i. Desarrollar y validar un nuevo método molecular basado en la PCR en tiempo real para la cuantificación precisa de espermatozoides en espermatecas de hembras de *C. capitata* (Capítulo 2).
- ii. Analizar de manera cuantitativa la transferencia de esperma por parte de machos, tanto silvestres como estériles, bajo diversas condiciones experimentales, para evaluar el impacto en la eficiencia reproductiva (Capítulo 3).
- iii. Investigar la capacidad de recópula y la eficacia en la transferencia de esperma de los machos estériles, con el fin de evaluar su potencial en programas de control de plagas basados en la TIE (Capítulo 4).

Estos objetivos se alinean con la meta global de avanzar en el conocimiento científico en el área de control biológico de plagas, proporcionando herramientas innovadoras y eficaces para su manejo y erradicación.

2

Desarrollo y validación de un método PCR
a tiempo real para estimar el esperma
almacenado en espermatecas



Capítulo 2

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PCR A TIEMPO REAL PARA ESTIMAR EL ESPERMA ALMACENADO EN ESPERMATECAS

2.1. Introducción

Una parte importante de la investigación sobre la biología reproductiva en los insectos se centra en la producción, transferencia y almacenamiento del esperma, y en dichos estudios, la detección y cuantificación de los espermatozoides tiene especial relevancia.

Para la cuantificación de los espermatozoides en insectos, se han empleado diversas técnicas, como la fluorometría (Reichardt y Wheeler, 1995), la citometría de flujo (Cournault y Aron, 2008; Rzymiski y col., 2012; Paynter y col., 2014) y la espectrofotometría de absorbancia (Harbo, 1975; Collins, 2005; Ciereszko y col., 2017). No obstante, el método más utilizado en muchas especies, entre las cuales se encuentra *C. capitata*, ha sido la cuantificación visual mediante el conteo directo, con o sin tinción, bajo un microscopio (Sakaluk y O'Day, 1984; Lorch y col., 1993; Rugman-Jones y Eady, 2007; Helinski y Knols, 2009; Bertin y col., 2010; Sturm, 2014; Krueger y col., 2017).

Aunque la cuantificación visual directa mediante microscopio es económica y sencilla, el proceso de preparación resulta tedioso y lento, además de que a menudo surgen dificultades como la presencia de glomérulos de espermatozoides que dificultan el conteo preciso (Sakaluk y O'Day, 1984; Locke y col., 1990; Snow and Andrade, 2004; De Jesus y Reiskind, 2016). Para prevenir la formación de estos

aglomerados, es común utilizar soluciones con detergentes (como el SDS, dodecil sulfato de sodio), aunque lo más conveniente es procesar las muestras rápidamente después de sacrificar y diseccionar a la hembra, mientras los espermatozoides aún presentan movilidad, lo que representa una limitación en el proceso. Otra limitación viene dada por la imposibilidad de extraer completamente el esperma de los órganos de almacenamiento (Sakaluk y O'Day, 1984; Locke y col., 1990; Snow y Andrade, 2004; Collins, 2005; Fritz y col., 2010).

Los avances en biotecnología han facilitado el desarrollo de técnicas moleculares avanzadas, las cuales abren la puerta a la creación de nuevos métodos aplicables a la detección y cuantificación de espermatozoides. Estos métodos pueden superar las limitaciones asociadas a las técnicas tradicionales y permitir su uso en el análisis de alto rendimiento, abarcando un amplio número de muestras con alta precisión.

Un primer método basado en el uso de técnicas moleculares empleado para la detección de esperma en *C. capitata* fue el de diagnóstico mediante PCR basado en secuencias conocidas del cromosoma Y (Willhoeft y Franz, 1996; Zhou y col., 2000) y un polimorfismo mitocondrial de la cepa Vienna-8 (Gasparich y col., 1995; Spanos y col., 2000), capaz de determinar la presencia de esperma estéril (cepa Vienna) en las espermatecas de hembras de *C. capitata*. Este método de diagnóstico consiste en la disección de espermatecas, extracción de ADN y dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). La primera PCR para detectar la presencia de espermatozoides (presencia del cromosoma Y) y la segunda junto con un análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) para identificar espermatozoides cepa Vienna (San Andrés y col., 2007). Este estudio se amplió posteriormente comprobando la universalidad de los marcadores moleculares empleados y probando nuevos métodos de conservación de ADN y extracción de esperma (Juan-Blasco y col., 2013c).

Los primeros intentos de cuantificación de esperma basados en PCR en tefritidos se llevaron a cabo en *Anastrepha suspensa* mediante el uso de marcadores microsatélites (Fritz y col., 2010; Dhakal y col., 2018) comparando los espermatozoides contenidos en los órganos de almacenamiento de la hembra respecto a una curva estándar generada con un número conocido de espermatozoides obtenidos por disección de testículos. Sin embargo, este enfoque metodológico presenta el inconveniente que el uso de dichos marcadores nucleares requiere la eliminación completa de las células maternas de los órganos de almacenamiento para evitar la contaminación con ADN de la hembra durante la PCR, lo que supone una dificultad técnica.

En este contexto surge el primer objetivo de esta tesis, desarrollar un método molecular de cuantificación basado en la aplicación de una PCR basado en marcadores de cromosoma Y para estimar la cantidad de espermatozoides almacenados en espermatecas de hembras de *C. capitata*. Para ello, se establece el siguiente procedimiento experimental que implica:

- El rediseño de marcadores moleculares específicos para células espermáticas procedentes de machos cepa silvestre y Vienna-8.
- La preparación de una curva estándar a partir de moléculas clonadas de la secuencia objetivo-específica para la cuantificación absoluta mediante PCR en tiempo real.
- La validación del método PCR en tiempo real por comparación con el método clásico de recuento directo de espermatozoides al microscopio y PCR convencional semicuantitativa.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Colonias de *Ceratitis capitata*

2.2.1.1. Cepa silvestre

Todos los adultos de *C. capitata* de la cepa silvestre utilizados en el desarrollo de esta tesis procedieron de una cría de laboratorio mantenida en las instalaciones del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto

Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Dicha cría se inició en 2014 a partir de pupas obtenidas de frutos infestados de forma natural recogidos en parcelas de cítricos de la Comunidad Valenciana, y se fue renovando anualmente con individuos procedentes de campo.

En las primeras generaciones, la puesta de huevos y el desarrollo de los estados inmaduros tuvo lugar sobre frutos de mango *Mangifera indica* L. (Sapindales: Anacardiaceae) hasta la adaptación de las hembras al sistema de cría en laboratorio en la cual se consigue que realicen la puesta de huevos a través de ventanas de tela. La caja de adultos reproductores era de acrílico transparente de 42 x 32 x 30 cm con una ventana frontal desmontable de tela muselina en la cual las hembras ponen los huevos y caen por gravedad a una bandeja de agua. Los huevos colectados se transferían a una dieta artificial (a una ratio de 16 huevos por gramo de dieta) donde se desarrollaban hasta llegar a su último estadio larval momento en que abandonaban la dieta simulando el salto que se produce de los frutos al suelo para pupar de forma natural. La dieta larval se elaboraba con 154 ml de agua, 28 g de azúcar, 14,5 g de levadura de cerveza, 1 g de ácido benzoico, 1,12 g de metilparabeno y 1,12 g de propilparabeno por cada 100 g de salvado de trigo. Con las pupas recuperadas y antes de la emergencia de los adultos, se preparaba la nueva caja de adultos reproductores para continuar con el ciclo de cría y parte se reservaban para realizar los ensayos correspondientes. Para la alimentación de los adultos se utilizó una mezcla de azúcar y extracto de levadura (4:1; peso: peso) y agua. La colonia se mantuvo en condiciones ambientales controladas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 10\%$ de humedad relativa y un fotoperiodo de 14:10 h (L:O).

Para garantizar la virginidad de los adultos silvestres utilizados en las pruebas, los machos se separaron de las hembras durante las primeras 24 horas tras su emergencia de la pupa, periodo en el que son sexualmente inactivos, y mantenidos en cajas separadas por sexo y en dos cámaras climáticas diferentes a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de humedad relativa y fotoperiodo de 14:10 h (L:O).

2.2.1.2. Ceba Vienna-8 estériles

Los machos estériles empleados en los experimentos procedieron de la cría masiva ubicada en la Biofábrica de Insectos Estériles de Caudete de las Fuentes (Valencia) y cuya producción está destinada al programa TIE para el control de poblaciones de *C. capitata* en la Comunidad Valenciana. Los machos eran de la cepa Vienna-8 GSS Valencia sujetos a las condiciones estándar de desarrollo, tinción y esterilización establecidos en el programa TIE Comunidad Valenciana (detalles recogidos en el apartado 1.2.6.2 del Capítulo 1).

La toma de individuos (aproximadamente 400 machos por experimento) se realizaba durante la colecta en frío del proceso productivo (después de haber recibido la aromaterapia con jengibre), momento en que los adultos están inactivos para poder transferirlos de las jaulas de emergencia a los cartuchos refrigerados empleados en la liberación aérea. Dicho paso del proceso productivo se ubica en el Centro de Evolución, Empaque y Liberación situado en las instalaciones del IVIA.

2.2.2. Manejo de las moscas y experimentos de acoplamiento en laboratorio

Los adultos silvestres y Vienna-8 que iban a ser utilizados en los experimentos, se mantenían en cajas ventiladas de metacrilato transparente (20 × 20 × 20 cm) con agua y una dieta proteica (4:1 p:p, azúcar: levadura). A los machos estériles se les incluía también la levadura para simular las condiciones nutricionales en campo, donde, como los machos silvestres, disponen de recursos proteicos, siendo la densidad máxima por jaula de 300 individuos.

La arena experimental para los ensayos de apareamiento consistió en jaulas de metacrilato transparente de 30 × 30 × 50 cm (45 litros) con dos aberturas frontales (14 × 14 cm) provistas de mangas de tela muselina para tener acceso a las parejas que se fueran formando en su interior. Estos ensayos se realizaron durante la mañana, entre las 10:00 y 14:00 horas según la época del año, y en condiciones de laboratorio con $25 \pm 5^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ de humedad relativa y luz natural

procedente de una ventana (intensidad de luz 600 ± 100 luxes). Todos los machos y las hembras utilizadas eran vírgenes, de 4 días de edad y sexualmente maduras.

El ensayo se iniciaba liberando primero los machos vírgenes (del tipo silvestre o Vienna-8, según el cruce); se colocaban solos en la arena de apareamiento durante diez minutos para que se asentaran y a continuación se ofrecían hembras silvestres vírgenes en proporción 1:1. Durante las dos horas siguientes a la formación de la primera pareja se recogían cuidadosamente todas las parejas que se iban formando en cada una de las arenas. Cada pareja se introducía en un tubo de ensayo de poliestireno, de 12 mm de diámetro x 75 mm de altura y un volumen aproximado de 5 ml, y se registraba la hora de inicio del acople. Las cópulas se interrumpían de forma aleatoria al cabo de cuatro periodos de tiempo (10, 30, 60 y 90 min) aplicando ligeros golpes en los tubos. Una vez separadas las parejas, los machos se desechaban y las hembras se conservaban de forma individualizada en los tubos a -20°C hasta la extracción del ADN de sus espermatecas o bien se diseccionaban las espermatecas en fresco ese mismo día de la cópula para observar el espermatozoide al microscopio. Tanto la congelación como la disección en fresco se realizaba en ambos casos una hora después del momento de la separación. Este intervalo de tiempo se fija teniendo en cuenta las observaciones recogidas en el estudio de Marchini y col. (2001) en *C. capitata*, en el cual se indica que una hora después de finalizar del apareamiento la mayoría de los espermatozoides han conseguido llegar a los receptáculos espermatecales y sólo unos pocos siguen presentes en los conductos espermatecales (principalmente en la parte apical cerca de las espermatecas).

Se realizaron dos tipos de cruce: (1) machos silvestres con hembras silvestres y (2) machos estériles Vienna-8 con hembras silvestres. Los experimentos de apareamiento se repitieron varias veces en el tiempo hasta obtener un mínimo de 65 hembras por cada combinación experimental (4 duraciones de acople x 2 tipos de cruces). En cada experimento se conservó una muestra de hembras vírgenes a -20°C para utilizarse como controles negativos en los análisis.

2.2.3. Disección de las espermatecas

El estudio se centró en analizar los espermatozoides alojados sólo en las espermatecas ya que éstas representan los órganos principales de almacenamiento. Las espermatecas se aislaron por disección del resto de órganos reproductivos de la hembra para reducir la interferencia del ADN de la hembra en el proceso de extracción del ADN espermático y su posterior análisis. La disección se realizó en condiciones asépticas, bajo un microscopio estereoscópico y empleando pinzas de microdisección y agujas entomológicas esterilizadas. El tracto reproductivo interno de cada hembra se extrajo sujetando los primeros segmentos abdominales y tirando suavemente del ovipositor (Figura C2.01). A continuación, con las agujas entomológicas se desprendían las espermatecas del resto de tejidos circundantes y se cortaban los conductos espermatecales por su parte apical (primer tercio del conducto). Durante este proceso de disección, el cuerpo de cada hembra se disponía sobre un trozo de papel de filtro esterilizado y para evitar la desecación

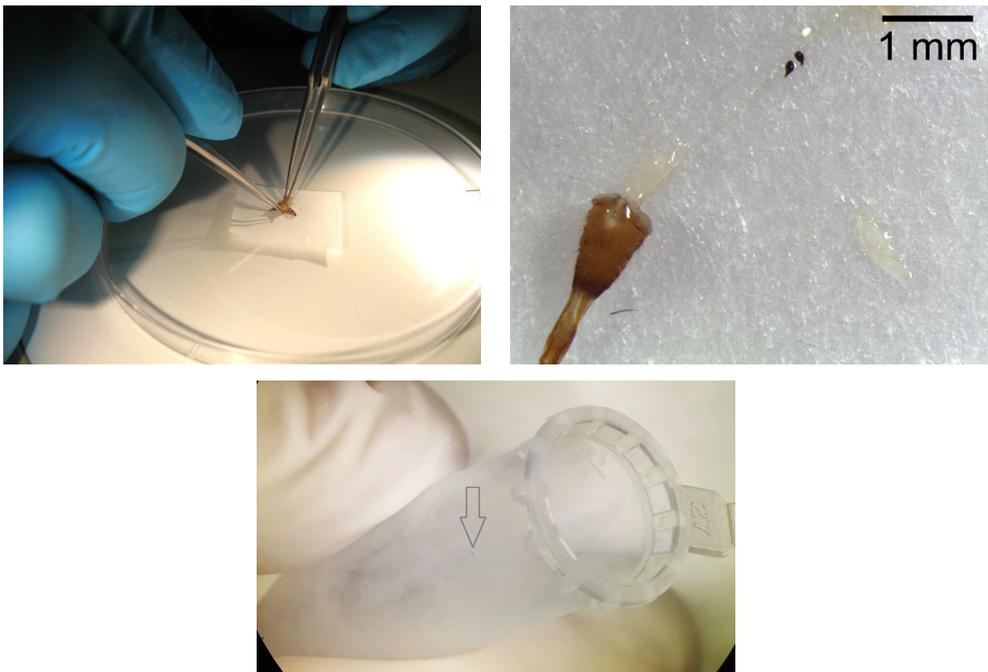


Figura C2.01 | Disección de las hembras y aislamiento de las espermatecas del resto de órganos reproductivos para su extracción de ADN. La flecha en la imagen inferior indica la localización de las espermatecas depositadas en la pared interior del microtubo.

de los tejidos y facilitar la extracción de las espermatecas, se colocaba una gota de solución tampón TNES, la misma que iba a ser utilizada a continuación en la extracción de ADN (composición recogida en el apartado siguiente 2.2.4 del presente capítulo). Las dos espermatecas extraídas de cada hembra eran procesadas juntas como una única muestra.

2.2.4. Extracción de ADN

La extracción de ADN de las espermatecas aisladas se realizó en base al método “*salting-out*” propuesto por Sunnucks y Hales (1996) con algunas modificaciones; queda recogido a continuación el protocolo seguido.

Las espermatecas intactas se transfirieron a un microtubo de 1,5 ml con 100µl de solución tampón TNES (50-mM Tris-HCl pH 7,5, 400-mM NaCl, y 20-mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS) donde se aplastaron con un micropistilo esterilizado sobre la superficie interna del tubo. Una vez homogeneizado el contenido de la muestra eran incubadas con 200 µl de TNES y 100 µg/ml de Proteinasa k (20mg/ml) (Thermo Scientific) a 60°C durante una hora, y posteriormente a 37°C durante 16-18 horas. Después de la incubación, las proteínas se precipitaron añadiendo 85 µl de NaCl 5M a cada tubo y agitando enérgicamente los tubos durante 30 segundos. A continuación, los tubos se centrifugaban a 14.000 rpm durante 10 min a 15°C, e inmediatamente el sobrenadante (310 µl) era transferido a un microtubo limpio. El ADN era precipitado con 250 µl de isopropanol frío (-20°C). Después de mezclar mediante inversiones suaves e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se realizaba un centrifugado a 12.000 rpm durante 10 min a 15°C. Después de desechar el isopropanol por decantación del tubo, el pellet de ADN era lavado con 200 µl de etanol frío al 70% (-20°C) mediante inversiones suaves. Por último, se realizaba un último centrifugado a 12.000 rpm durante 5 min a 15°C, y el etanol se eliminó por decantación del tubo. El pellet de ADN se dejaba secar a temperatura ambiente colocando los tubos abiertos e invertidos sobre una gradilla metálica debajo de una campana extractora. Una vez el pellet estuviera completamente seco (aproximadamente entre una y dos

horas), el ADN se resuspendió en 15 μ l de LTE (50-mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1-mM EDTA pH 8.0) agitando las muestras a 3.000 rpm durante 30 segundos.

Para la puesta a punto del método de diagnóstico, se prepararon muestras de ADN de referencia a partir de abdómenes de individuos adultos procedentes de las colonias silvestres y Vienna-8. Los abdómenes se introdujeron en microtubos de 1,5 ml (un abdomen/microtubo) que contenían 100 μ l de solución tampón (TNES), y con la ayuda de un micropistilo fueron aplastados y homogeneizados con la solución. La extracción de ADN se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo utilizado para las espermatecas, con la única diferencia que el ADN era resuspendido con 25 μ l de LTE.

Para evaluar algunos parámetros de calidad del ADN obtenido se tomaron medidas por medio de absorbancia en un NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Todas las muestras de ADN se preservaron a -20°C hasta su amplificación por PCR.

2.2.5. Diseño de marcadores y test de detección

A partir de las secuencias obtenidas de los marcadores específicos del cromosoma Y de *C. capitata* (CcYsp), y teniendo en cuenta el genoma publicado de esta especie (Papanicolaou y col., 2016; NCBI, 2017), se rediseñaron nuevos marcadores de esperma utilizando la base de datos pública *GenBank*, el programa de alineación de secuencias *Clustal Omega* y el software de análisis de cebadores *Primer3* (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser y col., 2012) para alinear secuencias y analizar marcadores. El criterio principal fue generar un amplicón único de tamaño adecuado (de 50-200 pb; óptimo para la mayoría de las PCR en tiempo real) para evitar la formación de multibandas, ya que el marcador CcYsp sobre ADN de macho produce un patrón multibandas que van de las 300 a 700 pb.

Mediante PCR convencional se probaron dos pares de marcadores (Tabla C2.01) a cuatro temperaturas anillamiento diferentes (55, 56, 59 y 60 °C) utilizando ADN de abdómenes de machos y de espermatecas de hembras apareadas como

controles positivos y ADN de abdómenes y espermatecas de hembras vírgenes como controles negativos. Para ello se empleó un termociclador con gradiente de temperatura (Applied Biosystems Veriti 96-Well) y se preparó una reacción que contenía 1 µl de ADN molde (en el caso de los abdómenes, las muestras se diluyeron previamente a 10^{-2}), 0,2 mM dNTPs, 1x tampón Taq, 1,75 mM $MgCl_2$, 0,75 U de ADN polimerasa y 0,25 µM de cada marcador molecular en un volumen final de 20 µl (Tabla C2.02).

Tabla C2.01 | Secuencia de nucleótidos (5'-3') de los marcadores moleculares testados para amplificar un fragmento específico del cromosoma Y de *C. capitata* y tamaño del fragmento amplificado. El marcador CcYsp-dir obtenido por San Andrés et al. (2007), resto de marcadores diseñados en el presente estudio.

Nombre de los marcadores	Secuencia del marcador directo	Secuencia del marcador reverso	Tamaño de banda (pb)
CcYsp-dir / CcYsp-R2	CGA AGC CAG ACA TAC ACG AGG AG	TCG TTT GGA AAA GTG TGG TTC	112
CcYsp-FF / CcYsp-RR	AGT GAT GCA CCA CAC ACA CA	ATT GAT TCC TGG ACG AGT GG	96

Tabla C2.02 | Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de amplificación mediante PCR convencional para cada muestra.

Reactivo	Volumen (µl)
ADN	1,00
Taq (1 U/µl) (Biotools)	0,75
Tampón Taq 1x (Biotools)	2,00
$MgCl_2$ (50mM) (Biotools)	0,70
dNTPs (10mM) (Thermo Scientific)	0,40
Marcador directo (10µM)	0,50
Marcador reverso (10µM)	0,50
Agua ultrapura (Invitrogen)	14,15
Volumen final	20,00

Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 4 minutos, 35 ciclos a 92 °C durante 30 segundos, las temperaturas de anillamiento a testar durante 30 segundos, y 72°C por 30 segundos, seguidos de un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos. La comprobación del producto amplificado se realizó mediante gel de agarosa. Los productos de PCR se tiñeron con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10.000X (Biotium) y se separaron por electroforesis en gel de agarosa D-1 con bajo contenido de EEO (Pronadisa, Sumilab S.L., Madrid, España) al 2% en tampón TAE 1x (PanReac Aplichem-ITW Reagents). Para cada muestra se tomaron 10 µl del producto amplificado y se mezclaron con 2 µl de tampón de carga 6x (FisherScientific) y GelRed® (100:1; v:v), cargando a cada pocillo 10 µl de esta mezcla. La migración se realizó con un voltaje constante de 90V durante 30 minutos (Sub-Cell GT Cell BioRad) y se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV). La temperatura óptima de anillamiento se estableció mediante la intensidad de la banda obtenida en la visualización UV del gel de agarosa.

2.2.6. Preparación de la curva estándar para la PCR en tiempo real

Para la cuantificación del esperma mediante PCR en tiempo real se generó una curva estándar a partir de cantidades conocidas de la secuencia seleccionada del cromosoma Y. El material estándar utilizado para construir la curva se sintetizó a partir de una secuencia de ADN espermático procedente de muestras de espermatecas con esperma acumulado en su interior. La secuencia diana se multiplicó mediante PCR convencional utilizando los marcadores específicos del cromosoma Y y la temperatura de hibridación seleccionadas ambas en la fase previa. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior 2.2.5.

Los productos de PCR se purificaron mediante el kit comercial *Invisorb DNA Cleanup* (Stratec Molecular, Berlin, Germany) siguiendo el protocolo 4 (Stratec Molecular, 2015). La concentración de ADN del producto purificado se estimó en el NanoDrop 2000c y se realizó un proceso de clonación con la bacteria *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) mediante plásmidos.

La secuencia diana de ADN (inserto) se ligó en un vector pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, USA). El proceso de ligación se realizó según el protocolo descrito por el fabricante pero ajustando la mezcla de la reacción para un ratio vector:inserto de 1:3.3 y un volumen final de reacción de 25 μ l (Tabla C2.03).

Tabla C2.03 | Reactivos y volúmenes utilizados para la reacción de ligación del vector pGEM®-T (Promega).

Reactivo	Volumen (μ l)
Tampón de ligación 2x, ADN ligasa (Promega)	12,5
pGEM(R)-T Easy Vector (50ng) (Promega)	0,5
Producto PCR purificado (inserto)	11,0
ADN ligasa (Promega)	1,0
Volumen final	25,0

El vector recombinante (pGEM-T_CcYsp) se introdujo en células competentes de *E. coli* cepa JM109, siguiendo el protocolo de transformación indicado por el mismo fabricante, aunque empleando los 25 μ l de la reacción de ligación (vector recombinante) con 100 μ l de las células competentes. Este vector de clonación, que contiene un gen resistente a la ampicilina (gen lacZ que codifica para la enzima β -galactosidasa), va a permitir seleccionar las colonias transformadas de *E. coli* donde hayan entrado los plásmidos al ser crecidas sobre un sustrato adecuado. Se realizó una incubación de las bacterias en medio LB (caldo de lisogenia) durante 1 hora a 37°C y posteriormente se cultivaron en placas con medio de cultivo LB con ampicilina/IPTG/X-Gal (100 μ g de ampicilina por ml de medio LB; 7 μ l de 100mM IPTG y 40 μ l de 50mg/ml X-Gal por placa). El X-Gal es un sustrato cromogénico que detecta la actividad de la β -galactosidasa, y el IPTG es un inductor de esta enzima, con lo cual con la conjunción de ambos es posible en función del color distinguir las colonias con presencia del vector recombinante (blancas) de las no recombinantes (azules). Se mantuvieron overnight a 37°C, y al día siguiente se seleccionaron aquellas colonias con coloración blanca. Estas colonias seleccionadas se replicaron mediante una siembra con estría en placas

con medio LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Se realizó una segunda selección de las colonias recombinantes que se habían replicado el día anterior; en esta ocasión, los clones bacterianos de cada colonia se sembraron en medio líquido de LB con ampicilina y se mantuvieron a 37°C *overnight* en una plataforma agitadora para su crecimiento (Figura C2.02).

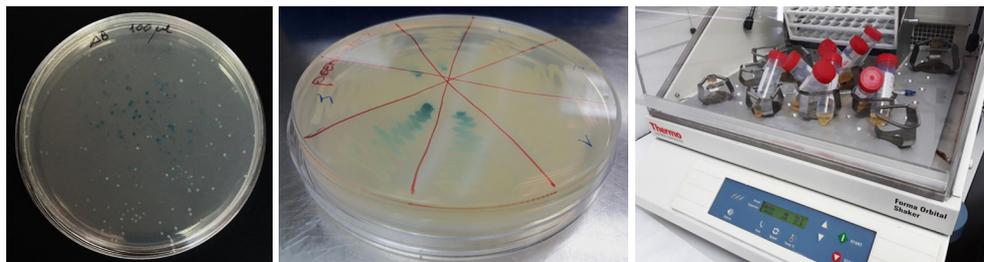


Figura C2.02 | Selección de colonias transformantes de *E. coli* e incubación para crecimiento de clones bacterianos. Colonias con presencia del vector recombinante en color blanco y las no recombinantes en azul.

De estos cultivos bacterianos recombinantes, se extrajo ADN plasmídico (ADNp) que contenía la secuencia de ADN de interés clonada. Para ello, se empleó el kit *Invisorb Spin Plasmid Mini Two* (Stratec Molecular, Berlin, Germany) siguiendo el protocolo 1 (Stratec Molecular, 2016), con solo una modificación en el paso 10 que se repite dos veces y se sustituye la solución de elución por agua ultrapura. La concentración y calidad del ADNp purificado se midió con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Para confirmar la presencia del inserto diana, se digirió una muestra de los ADNp purificados con la enzima de restricción EcoRI (Takara) a 37 °C durante 1 h y se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Teniendo en cuenta el espectro y las relaciones de absorbancia proporcionadas por el NanoDrop e identificar la presencia del inserto en gel de agarosa, se escogió el ADNp purificado de mayor calidad como material clonado para hacer la curva de estandarización. Una muestra de este material se llevó para secuenciar al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia. La cuantificación de pGEM-TCCySp (vector e inserto) en picomoles se realizó

considerando el peso promedio de un par de bases (660 Da) y el número de bases pares de vector e inserto (N_b), según la siguiente fórmula matemática:

$$\text{pmol de dsDNA} = \frac{\mu\text{g de dsDNA} \times 10^6}{660 \times N_b}$$

Para estimar el número de copias de moléculas diana pGEM-TCCySp (plásmidos) se utilizó la constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$ moléculas/mol) y se calculó por microlitro (volumen utilizado como molde en cada PCR cuantitativa en tiempo real). A partir del material clonado se preparó una serie de diluciones seriadas en base 10 con agua ultrapura que sirvieron de muestras de referencia para generar la curva estándar necesaria para el análisis cuantitativo en la PCR a tiempo real. Este material de referencia se almacenó a -20 °C para ser utilizado en cada prueba de PCR realizada.

2.2.7. Amplificación PCR en tiempo real

Para la PCR en tiempo real se utilizó el sistema LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) y el reactivo intercalante SYBR Green como fluoróforo para la detección del ADN de doble cadena. La reacción se llevó a cabo con 5 μl de Maxima SYBR Green I/ROX qPCR Master mix (2x) (Thermo Scientific), 0,5 μM de cada marcador molecular y 1 μl de molde de ADN en un volumen final de 10 μl . Dicho Master mix contiene ADN polimerasa Taq Maxima Hot Start, dNTPs, SYBR Green I y un tampón PCR optimizado que previene la formación y amplificación inespecífica de los dímeros de marcadores.

En cada prueba se incluyeron muestras de ADN de espermatecas de hembras vírgenes y dos controles sin ADN molde (sólo el contenido de la reacción de PCR) como controles negativos, y como muestras control positivas, los mismos materiales de referencia para generar la curva estándar los cuales se agregaban por duplicado a la microplaca (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White) en cada ejecución.

El protocolo de PCR en tiempo real constaba de un primer ciclo de 95 °C durante 10 min para la desnaturalización inicial y activación de la Taq polimerasa, 40 ciclos de amplificación (95 °C durante 15 s para la desnaturalización, 59 °C durante 30 s para el anillamiento y 72 °C durante 30 s para la extensión) seguido de un ciclo final de 95°C durante 5 s y 60°C durante 1 min para la lectura de la curva de fusión (*melting curve*) que permite verificar la identidad de los productos de PCR. La adquisición de datos, los ajustes de la curva estándar y el análisis se realizaron con el software versión 1.5 LightCycler ® 480 incluido en el mismo instrumento.

2.2.8. Validación del método

La validación del método de qPCR en tiempo real desarrollado en este estudio se llevó a cabo por comparación con otros dos métodos: el conteo directo de espermatozoides al microscopio, uno de los más utilizados tradicionalmente en estudios de transferencia de esperma, y un segundo método basado en una PCR convencional semicuantitativa.

2.2.8.1. Recuentos de espermatozoides en microscopio

A partir de hembras procedentes de los experimentos de apareamiento (apartado 2.2.2), se realizó un recuento de espermatozoides con el método de cuantificación por observación directa en microscopio. Se tomaron espermatecas de hembras acopladas con machos de cada cepa (silvestres y estériles Vienna-8) y de los cuatro tiempos de duración de la cópula establecidos en el diseño experimental (10, 30, 60 y 90 min). El mismo día del experimento de apareamiento y una hora después de ser interrumpida la cópula, las hembras se aletargaron por frío (durante 1-2 minutos a -15°C) y se diseccionaron bajo un microscopio estereoscópico en condiciones asépticas, siguiendo el mismo procedimiento empleado en la extracción de espermatecas utilizadas para la obtención de ADN (apartado 2.2.3). Una vez aisladas el par de espermatecas de cada hembra, se transfirieron a un portaobjetos con una gota (5–10 µl) de solución detergente Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,5 %. Cada portaobjetos disponía de una cuadrícula

grabada de 20 x 20 mm con 20 divisiones verticales para realizar el recuento de los espermatozoides. Para romper las espermatecas se utilizó la cabeza esférica de un alfiler entomológico a modo de micropistilo. Las espermatecas son estructuras quitinizadas, por ello, se requería romperlas bien en microfragmentos para liberar su contenido, esparcirlo de forma homogénea sobre el área de recuento y así evitar posibles aglomeraciones de esperma que dificultasen su recuento. Al secarse la muestra, quedaba fijada en el portaobjetos y se guardaban en el congelador (-20°C) en cajas portaobjetos hasta su tinción (sin el cubreobjetos).

Para realizar el conteo al microscopio, los espermatozoides se tiñeron con el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), un marcador fluorescente que puede atravesar las membranas plasmáticas de las células muertas y unirse al ADN celular, y cuando se expone a la luz ultravioleta emite una señal fluorescente azul (435 nm).

En cada portaobjetos donde estaba fijada la muestra espermática se añadía 5 µl de solución DAPI diluida a 4 µg/ml (1mg /ml; Thermo Scientific™)(Bertin y col., 2010); dicho volumen se extendía con la punta de un alfiler por toda la cuadrícula de conteo y se cubría con un cubreobjetos de vidrio para proteger la muestra y el objetivo del microscopio. Después de dejar reposar la solución durante 10 minutos en oscuridad para evitar la pérdida de la señal de luz fluorescente, se visualizaron las muestras en microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse E800 con filtro UV-2A: Ex 330-380, DM 400, BA 420) a 200x aumentos. Se contaron todas las cabezas de espermatozoides presentes en las divisiones impares del área de conteo incluyendo aquellas que estuvieran tocando el límite derecho de dichas divisiones (Figura C2.03) y se calculó el número total usando el factor multiplicador correspondiente.

2.2.8.2. PCR convencional semicuantitativa

El segundo método utilizado para validar los resultados obtenidos en la qPCR en tiempo real fue la PCR convencional semicuantitativa.

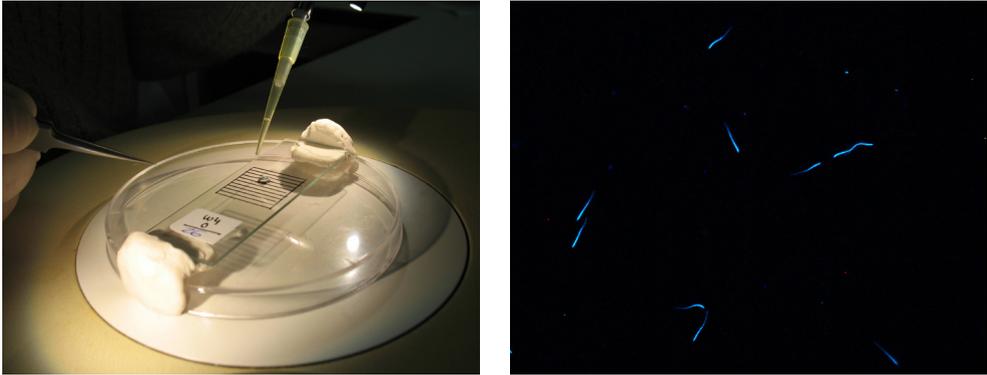


Figura C2.03 | Rotura de las espermatecas en el área de recuento para la tinción de los espermatozoides con DAPI (izquierda) y recuento directo de las cabezas en el microscopio de fluorescencia (200x) (derecha).

A partir de un grupo de muestras de ADN de espermatecas y de los materiales de referencia empleados para generar la curva estándar para la cuantificación a tiempo real (apartado 2.2.6) se realizó una PCR convencional. Se emplearon los mismos marcadores seleccionados para la detección del espermatozoides en la qPCR a tiempo real (cromosoma Y), y las condiciones de amplificación fueron las que se describen en el apartado 2.2.5, excepto que el volumen de ADN molde presente en la reacción fue de 2 μ l.

Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Las intensidades de banda de los productos de amplificación de cada muestra de ADN se compararon con la obtenida de los materiales estándar, asignando valores de abundancia a cada muestra (hasta 6 niveles). Los materiales de referencia se amplificaron en cada PCR para que la comparación tuviera lugar siempre entre muestras procedentes de una misma reacción. Ya que todas las muestras no podían ser visualizadas en el mismo gel, se aseguró de mantener constante el tamaño, espesor, y densidad de todos los geles de agarosa y las condiciones de electroforesis.

2.2.9. Análisis de datos

Para obtener el número de copias de la secuencia-objetivo del cromosoma Y en las muestras de ADN se utilizó el *LightCycler® 480 Software Package versión 1.5* (Roche Diagnostics); los valores umbral de número de ciclos (Ct) de las muestras se calcularon mediante el método cuantitativo absoluto por segunda derivada máxima y la curva estándar obtenida por el software se generó como una línea de regresión lineal. A partir de las concentraciones obtenidas de este análisis se determinó el porcentaje de muestras positivas en esperma, codificando como 0 y 1 las muestras según el valor umbral de detección establecido en el ensayo.

Los efectos del tiempo de acoplamiento y la cepa del macho (donante de esperma) fueron analizados en los valores de detección de esperma obtenidos en el método qPCR a tiempo real mediante un análisis de la varianza (ANOVA) aplicando el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fisher LSD. Se realizó un análisis análogo con las cantidades de espermatozoides obtenidas mediante el método de recuento directo al microscopio.

Para la validación del método desarrollado, se realizó una comparación de pendientes de los modelos lineales ajustados obtenidos a partir de los valores medios de las concentraciones de esperma obtenidas mediante el método qPCR a tiempo real y los valores medios por cuantificación directa de espermatozoides al microscopio para los diferentes tiempos de acoplamiento evaluados, buscando la ausencia de diferencias mediante la prueba F de Fisher. Este análisis se realizó por separado para machos silvestres y Vienna-8 estériles. Mediante un análisis de correlación se comparó la abundancia de esperma obtenida en un grupo de muestras de ADN evaluadas tanto en el método PCR a tiempo real como en PCR semicuantitativa, evaluando la correlación entre ambos métodos con base al coeficiente de correlación de Pearson.

Los análisis estadísticos se realizaron con *Statgraphics® Centurion XVI* (StatPoint Technologies Inc, 2010). Se consideró un resultado estadísticamente

significativo cuando el p-valor fue menor a 0,001 con un intervalo de confianza del 95%. La normalidad de los datos fue evaluada utilizando el test Kolmogorov-Smirnov y, en donde se consideró oportuno, los datos de concentración relativa de esperma obtenidas mediante el método qPCR a tiempo real fueron transformados $\log(x+1)$.

2.3. Resultados

2.3.1. Desarrollo del método PCR a tiempo real basado en el cromosoma Y

Se diseccionaron un total de 280 hembras silvestres procedentes de los experimentos de acoplamiento para aislar sus espermatecas y extraer su ADN. Asimismo, se procesaron 15 abdómenes por cada sexo y cepa empleada en el estudio. Las cantidades de ADN total obtenidas por medio de las relaciones de absorbancia (NanoDrop 2000c), fueron rangos variables de 5-20 ng/ μ l en las muestras procedentes de espermatecas y 200-600 ng/ μ l en las de abdómenes. En cuanto a la calidad del material extraído se obtuvieron valores entre 0,9 y 1,6 para la relación de absorbancia 260/230, y entre 1,8 y 2,4 para la relación de absorbancia 260/280.

Los marcadores específicos del cromosoma Y seleccionados fueron el directo CcYsp-dir (5'-CGA AGC CAG ACA TAC ACG AGG AG-3') obtenidos por San Andrés y col. (2007) y el marcador reverso diseñado en este estudio CcYsp-R2 (3'-TCG TTT GGA AAA GTG TGG TTC -5') a la temperatura óptima de fusión de 59°C. Esta temperatura de fusión se determinó experimentalmente y se volvió clave para evitar apareamientos erróneos (*mismatch*) durante la amplificación por PCR. Los apareamientos erróneos ocurren cuando las bases de los marcadores no emparejan correctamente con la secuencia molde de ADN durante el proceso de amplificación. Esto puede provocar la formación de productos de amplificación inespecíficos o la ausencia de amplificación del producto deseado. En este estudio, se estableció dicha temperatura óptima de anillamiento a 59°C para evitar estos mismatches durante el proceso de amplificación del cromosoma Y con ADN femenino presente en las muestras.

El análisis de la amplificación se realizó con muestras de ADN de abdómenes de hembras y machos (cepa silvestre y Vienna-8) y de espermatecas con esperma almacenado en su interior (Figura C2.03). Los marcadores CcYsp-dir y CcYsp-R2 generaron un fragmento de ADN de 112 pb cuya secuencia está disponibles en la base de datos GenBank® (Dennis y col., 2014) con el número de acceso MN062263.

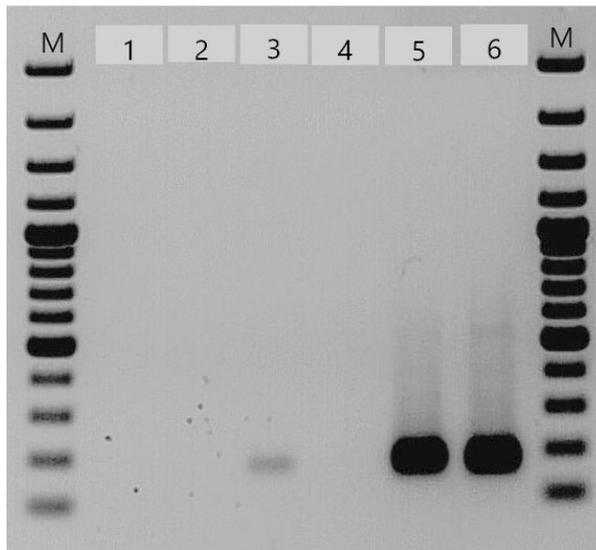


Figura C2.03 | Comprobación de los productos amplificados obtenidos a partir de los marcadores seleccionados para discriminar la presencia del cromosoma Y mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con GelRed. Detección en las muestras de ADN de espermatecas con esperma almacenado (carril 3) y de abdomen masculino (dilución 10^{-2}) cepa silvestre (carril 5) y Vienna-8 (carril 6) donde se identifica la banda de amplificación resultante de 112 pb. Las muestras sin amplificación corresponden a un control negativo PCR (carril 1), espermatecas de hembras vírgenes (carril 2) y abdomen femenino (dilución 10^{-2}) (carril 4). El marcador de peso incluido es una escalera de 100 pb (Thermo Scientific).

La curva estándar para la PCR cuantitativa se generó a partir de la solución obtenida del proceso de clonación de 10^{11} copias/ μ l de la secuencia diana cromosoma Y; después de la dilución en serie con agua ultrapura, el rango de la curva estándar abarcó de 10 a 10^6 copias del plásmido (i.e. 6 órdenes de magnitud). Los valores umbral del número de ciclos (Ct) observados oscilaron entre 26,6 y 12,9, lo que corresponde a una concentración entre 10 y 10^6 . Se realizaron réplicas temporales independientes, y la idoneidad de la curva

estándar generada se evaluó mediante las pendientes estimadas ($-3,0 \pm 0,06$) y las eficiencias de amplificación de los estándares ($2,2 \pm 0,03$) a partir de las curvas de calibración replicadas, evaluando también la linealidad del rango de concentración (R^2 promedio de 0,73; **Figura C2.04**).

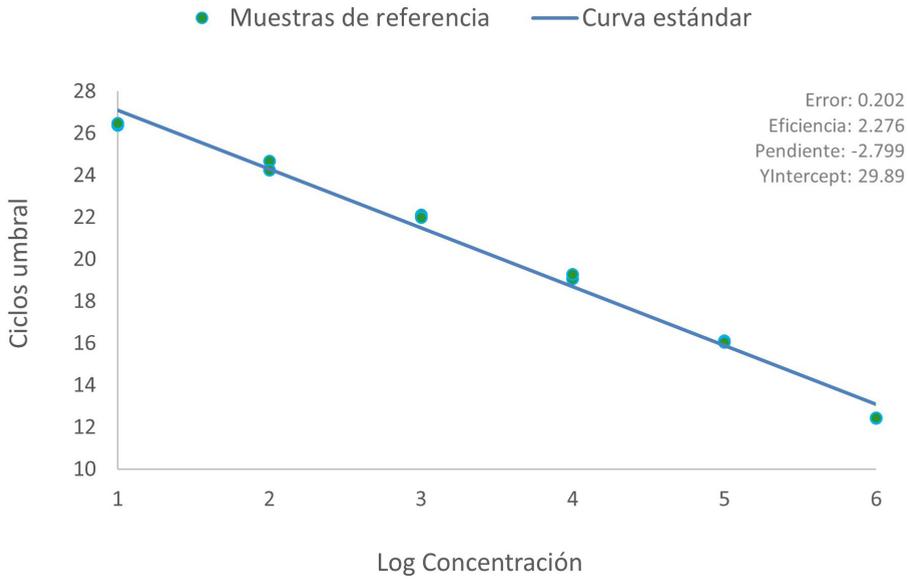


Figura C2.04 | Curva estándar para el amplificación objetivo cromosoma Y. El valor umbral de ciclo (Ct) se representa frente a diluciones seriadas fijadas en base 10 del plásmido de 10 a 10^6 copias por microlitro. Los puntos representan muestras emparejadas de las seis diluciones estándar preparadas (pendiente = $3,41$, $R^2 = 0,99$).

La detección mínima de la secuencia cromosoma Y se estableció en base a al análisis de los valores Ct y concentraciones obtenidas de los controles sin ADN molde, muestras de ADN espermatecas de hembras vírgenes y materiales estándar. Las muestras con valores de Ct superiores o iguales a 26 fueron negativas en la detección de la secuencia cromosoma Y y las muestras positivas mostraron valores que oscilaron entre 16,8 y 25,8. La concentración límite de detección se identificó cerca de las 80 copias/ μ l.

El 78% de las espermatecas procedentes de hembras que habían copulado (con un macho silvestre o estéril y durante 10, 30, 60 ó 90 minutos) se

determinaron como positivas, es decir se identificó del cromosoma Y lo cual implica presencia de espermatozoides en su interior. Dicho porcentaje varió significativamente al evaluarlo según el tipo de macho ($F_{1, 261} = 17,08$; $P < 0,001$) y la duración del apareamiento ($F_{3, 261} = 8,11$; $P < 0,001$), siendo mayor para las hembras que habían copulado con machos silvestres y cuando la duración del apareamiento superó los noventa minutos. La interacción entre estos dos factores (cepa y tiempo) no fue significativa ($F_{3, 261} = 0,14$; $P = 0,94$; **Tabla C2.04**).

Tabla C2.04 | Porcentaje de identificación positiva de la secuencia cromosoma Y mediante PCR cuantitativa absoluta en tiempo real (media \pm EE) en muestras de ADN de espermatecas de hembras de *C. capitata* que han copulado con machos silvestres o Vienna-8 en tres duraciones diferentes. Las diferencias entre las letras en superíndice denotan diferencias significativas entre el tipo de macho (mayúsculas) y la duración del apareamiento (minúsculas) (análisis multifactorial de varianza, $P < 0,001$).

Duración de la cópula (min)	Muestras positivas en hembras acopladas con machos silvestres	Muestras positivas en hembras acopladas con machos Vienna-8 estériles
10	66,7 \pm 8,0 ^{Aa}	44,4 \pm 12,1 ^{Ba}
30	79,1 \pm 6,3 ^{Aa}	60,9 \pm 10,4 ^{Bab}
60	95,5 \pm 3,2 ^{Ab}	70,4 \pm 9,0 ^{Bab}
90	97,2 \pm 2,4 ^{Ab}	80,0 \pm 7,4 ^{Bb}

2.3.2. Validación del método PCR a tiempo real para la cuantificación del esperma transferido.

La cantidad de copias de la secuencia objetivo (cromosoma Y) se tradujo para cada muestra de ADN espermatecas en la abundancia de espermatozoides contenidos en ellas; esta estimación se validó satisfactoriamente con el método propuesto de conteo directo de espermatozoides al microscopio y, adicionalmente, mediante PCR convencional semicuantitativa.

Con el microscopio de fluorescencia se analizaron un total de 259 preparaciones de espermatecas y en ellas el número de espermatozoides varió significativamente según el tipo de macho ($F_{1, 261} = 58,06$; $P < 0,001$) y la duración del apareamiento ($F_{3, 261} = 34,04$; $P < 0,001$) (**Tabla C2.05**). La interacción entre

ambos factores fue significativa ($F_{3,261} = 21,06$; $P < 0,001$) lo que probablemente se puede atribuir a una mayor transferencia de esperma con una mayor duración de la cópula en las hembras apareadas con machos silvestres en comparación con las hembras apareadas en machos estériles Vienna-8 ($F_{3,261} = 21,06$; $P < 0,001$).

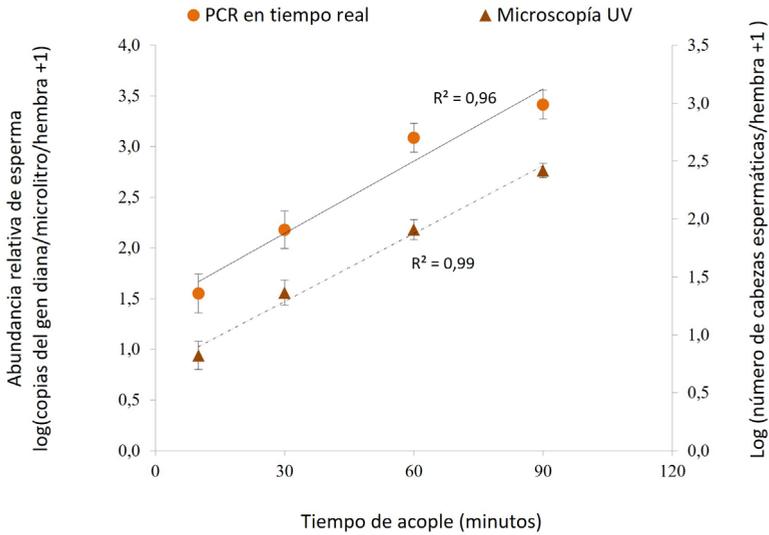
Tabla C2.05 | Número de espermatozoides (media \pm EE) estimados bajo el microscopio en espermatecas de hembras de *C. capitata* (apareadas con machos cepa silvestre o Vienna-8) en las tres duraciones de apareamiento fijadas. Cada valor se calculó a partir de al menos 30 hembras en cada tipo de macho y duración del apareamiento. Las diferencias entre las letras en superíndice denotan diferencias significativas entre el tipo de macho (mayúsculas) y la duración del apareamiento (minúsculas) (análisis multifactorial de varianza, $P < 0,001$).

Duración de la cópula (min)	N.º de espermatozoides en hembras acopladas con machos silvestres	N.º de espermatozoides en hembras acopladas con machos Vienna-8 estériles
10	15,2 \pm 3,4 ^{Aa}	5,4 \pm 2,2 ^{Ba}
30	41,8 \pm 7,1 ^{Aa}	14,6 \pm 2,6 ^{Bab}
60	142,8 \pm 32,4 ^{Ab}	32,12 \pm 4,9 ^{Bbc}
90	349,7 \pm 49,2 ^{Ac}	48,2 \pm 8,9 ^{Bc}

Al comparar las regresiones de abundancia de espermatozoides obtenidas en ambos métodos (qPCR a tiempo real y conteo directo al microscopio), no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes tanto para las muestras procedentes de hembras apareadas con machos cepa silvestre ($F_{1,287} = 162,67$; $P = 0,23$) como las apareadas en machos estériles Vienna-8 ($F_{1,230} = 54,96$; $P = 0,66$) (Figura C2.05).

Los resultados de la qPCR en tiempo real se compararon con valores obtenidos por PCR convencional semicuantitativa. Se evaluaron las muestras de ADN espermatecas de hembras apareadas con machos silvestres y los valores de PCR semicuantitativos se representaron según niveles de intensidad de banda de amplificación observados en la electroforesis en gel de agarosa. El análisis de correlación mostró una fuerte relación entre los valores estimados en cada método ($P < 0,001$; Pearson $r = 0,81$), lo que indica una abundancia de espermatozoides comparable. Solo cinco de las 93 muestras que dieron positivo en la qPCR en tiempo real dieron negativo en la PCR convencional; datos que

A. En hembras acopladas con machos silvestres



B. En hembras acopladas con machos V8

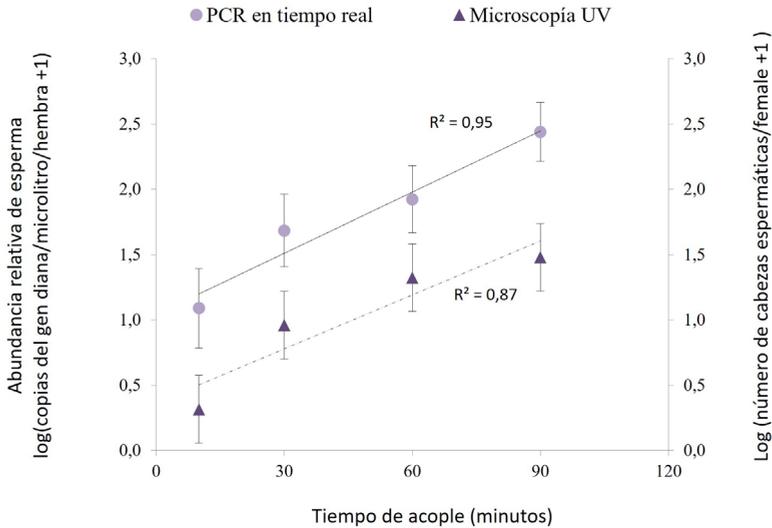


Figura C2.05 | Líneas de regresión de abundancia de espermatozoides estimadas por el método qPCR y recuento microscópico en hembras apareadas con machos silvestres (A) y estériles Vienna-8 estériles (B). Cada punto representa el promedio de al menos 30 hembras en cada método y tiempo de apareamiento. Las barras verticales indican los errores estándar.

podrían atribuirse a una mayor sensibilidad de la qPCR en tiempo real en la detección y cuantificación de espermatozoides (Figura C2.06).

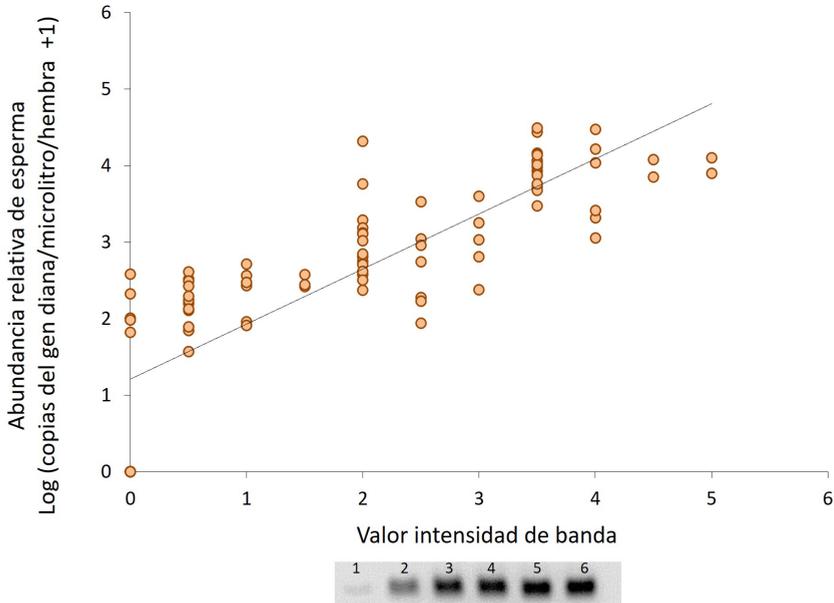


Figura C2.06 | Correlación entre los valores de qPCR en tiempo real (mostrados en el eje y) y la PCR convencional semicuantitativa (en el eje x). Análisis realizado en 93 muestras de hembras apareadas con machos silvestres en tres duraciones de cópula (10, 30 y 90 min). La imagen representa los seis niveles de referencia de la densidad de amplificación que corresponde a las concentraciones conocidas del material estándar preparado para la PCR a tiempo real.

2.4. Discusión

La complejidad del sistema de apareamiento de *C. capitata* ha generado numerosos y relevantes estudios científicos que examinan ampliamente los factores que intervienen en este sistema reproductivo sin embargo, la influencia de estos factores aún no está de todo clara en algunos casos. Con el método PCR a tiempo real propuesto en este estudio, se proporciona una herramienta potencial y valiosa para mejorar esta comprensión y también una base para el estudio en otros tefritidos. Se ha podido detectar y cuantificar la abundancia de espermatozoides transferido y almacenado posteriormente en las espermotecas de las hembras durante el apareamiento. El método se aplicó con éxito para el espermatozoides proveniente de las dos cepas evaluadas, machos silvestres y Vienna-8 GSS estériles.

La cuantificación de los espermatozoides fue posible a bajas concentraciones de la secuencia objetivo cromosoma Y (i.e., los espermatozoides almacenados en las espermatecas de las hembras apareadas durante 10 minutos). Esta sensibilidad no se había presentado en estudios previos de detección molecular en *C. capitata*; el ADN espermático contenido en las espermatecas solo había sido evaluado en hembras que habían cópula entre 45 minutos y 3 horas, las cuales contenían una mayor cantidad de esperma almacenado (San Andrés y col., 2007; Juan-Blasco y col., 2014, 2013a, 2013c). Este resultado obtenido en cuanto a la detección de espermatozoides en el interior de las espermatecas en apareamientos de 10 minutos, está en concordancia con las observaciones presentadas en otros estudios mediante observación directa al microscopio donde se encontraron espermatozoides después de cópulas interrumpidas de entre 4 y 15 minutos (Farias y col., 1972; Seo y col., 1990).

Con el procedimiento de validación mediante el recuento microscópico también se abordó la cuestión de si las roturas cromosómicas inducidas por la irradiación durante la esterilización de los machos de la cepa Vienna-8 podrían afectar a las regiones donde se diseñaron los marcadores. Como muestran nuestros resultados, los valores de la abundancia relativa de espermatozoides obtenidos por el método qPCR concuerdan con el recuento de cabezas de espermatozoides, tanto en espermatozoides transferidos durante las cópulas con machos silvestres como con machos Vienna-8 irradiados.

Respecto al procedimiento de obtención del ADN, todas las espermatecas se extrajeron de hembras conservadas a -20 °C (sin etanol) durante un máximo de tres meses; este intervalo que se estableció al observar que con tiempos de congelación más prolongados aumentaban las dificultades a la hora de aislar las espermateca sin producir rupturas y, consecuentemente, pérdida de espermatozoides. Se trata de muestras con escaso contenido en ADN, por ello en este proceso de extracción se debe tener especial cuidado con la disección y aislamiento de las espermatecas

y su posterior manejo. Las cápsulas espermatecales están esclerotizadas (Dallai y col., 1993) y es necesario romperlas con atención para liberar su contenido y obtener un extracto homogeneizado en cada microtubo. Este procesamiento de muestras requiere tiempo y un manejo adecuado y aunque se han examinado protocolos de extracción alternativos (Juan-Blasco y col., 2013c) y probado algunas modificaciones en estudios preliminares (datos no mostrados), no se han obtenido resultados más fiables. No obstante, una vez aprendido el manejo de las muestras, según nuestros registros, el tiempo necesario para la disección del abdomen, aislamiento de las espermatecas, homogeneización y adición de Proteínasa K para la incubación (primer paso en la extracción de ADN) se estimó en diez minutos por muestra. Otro aspecto a tener en cuenta de las muestras de ADN obtenidas únicamente del par de espermatecas es que presentan un escaso contenido en ADN y prácticamente todo procede de los tejidos de la hembra; esta escasez hace que cualquier problema en la degradación del ADN o la presencia de contaminantes suponga una limitación en su análisis ya que se trabaja cerca de los límites de detección.

Con los resultados obtenidos en este estudio se constata que el método qPCR en tiempo real diseñado es un método específico y útil para evaluar la transferencia y el almacenamiento del esperma en las espermatecas de las hembras en *C. capitata*. Por un lado ofrece una estimación precisa y ciertas ventajas respecto al diagnóstico microscópico, como la posibilidad de analizar muestras de hembras congeladas a más largo plazo y la ausencia de las dificultades asociadas en el recuento de espermatozoides por la presencia de agregaciones. Son diversos los trabajos que se han centrado en estudiar la influencia de factores como la edad, la dieta o el tamaño de los individuos en la transferencia y almacenamiento de esperma, sin embargo se han obtenido resultados muy variables (Churchill-Stanland y col., 1986; Orozco y Lopez, 1993; Blay y Yuval, 1997, 1999; Taylor y Yuval, 1999; Kaspi y col., 2000; Taylor y col., 2000, 2001; Papanastasiou y col., 2011; Costa y col., 2012; de Aquino y Joachim-Bravo, 2013). En este contexto multifactorial, el método molecular aquí presentado podría

contribuir a un análisis de muestras a mayor escala y por tanto reevaluar algunas de estas asociaciones no coincidentes.

Por otro lado y en relación con los programas TIE para el control de *C. capitata*, el método puede representar también una herramienta útil en el diagnóstico de parámetros de calidad aplicados al proceso de cría masiva, especialmente en estudios de laboratorio enfocados en la optimización de dietas o manipulación química en las condiciones de desarrollo en los cuales se busca mejorar el comportamiento sexual de los machos producidos y la transferencia de esperma.

En resumen, en el presente trabajo se documenta el primer método de cuantificación mediante PCR a tiempo real empleando marcadores del cromosoma-Y para un tefrítido. El método desarrollado ofrece para la especie *C. capitata* una estimación cuantitativa fiable de los espermatozoides transferidos y almacenados por las hembras en sus espermatecas después del apareamiento, y una mejora en cuanto a la reproducibilidad y rendimiento en el procesado de muestras respecto a los métodos cuantificación visuales empleados hasta el momento. Dicha flexibilidad experimental puede simplificar el estudio de aspectos sobre la biología reproductiva de este tefrítido relativos a la transferencia de espermatozoides, y aquellos involucrados en las evaluaciones de competitividad de los machos estériles dentro de los programas TIE.

3

Análisis cuantitativo de la transferencia de
esperma en machos silvestres y estériles:
efecto de la duración del acople y
la edad de los machos.



Capítulo 3

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA TRANSFERENCIA DE ESPERMA EN MACHOS SILVESTRES Y ESTÉRILES: EFECTO DE LA DURACION DEL ACOUPLE Y LA EDAD DE LOS MACHOS

3.1. Introducción

Los sistemas de apareamiento de los insectos varían según sus estrategias reproductivas y las interacciones entre ambos sexos pueden llegar a ser en ocasiones complejas; pese a ello, el éxito reproductivo de un macho se reduce al final en su habilidad para conseguir copular y fertilizar a las hembras (Thornhill y Alcock, 1983; Sivinski y Burk, 1989).

En una amplia diversidad de taxones, incluidos los insectos, la duración de la cópula puede ser un indicador importante de la cantidad de esperma transferido a la hembra (Simmons and Siva-Jothy, 1998). Sin embargo, no siempre la inseminación sigue inevitablemente a la cópula, algunos machos a menudo no logran una transferencia efectiva del esperma durante el apareamiento (Gilchrist y Partridge, 2000; García-González, 2004).

En *C. capitata* son muchos los estudios que abordan la transferencia de esperma, así como su almacenamiento durante y después del proceso de cópula y su posterior uso para la fertilización de los huevos (p.ej. Farias y col., 1972; Yuval y col., 1996; Seo y col., 1990; Taylor y col., 2000; Marchini y col., 2001b; de Aquino y Joachim-Bravo, 2013). Factores como la edad, el tamaño corporal, el estado nutricional, la duración de la cópula o la irradiación, dirigida a la esterilización de

individuos para los programas TIE, han sido considerados como determinantes en la transferencia y almacenamiento del esperma.

En muchas especies de insectos, se ha observado que la edad es un factor intrínseco que puede interferir con las señales de reclamo sexual de los machos o con su integridad somática modulando su atractivo sexual, competitividad y rendimiento de apareamiento (Delisle, 1995; Moore y col., 2001; Papadopoulos y col., 2004; Rugman-Jones y Eady, 2007; Fischer y col., 2008). En el caso de la mosca de la fruta mejicana *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae), estudiando la relación de la edad del macho con la transferencia de esperma, se obtuvo que los machos de mayor edad producían más esperma (Reyes-Hernández y Pérez-Staples, 2017) pero no se traducían en un mayor almacenamiento y éxito de inseminación (Harwood y col., 2015; Herrera-Cruz y col., 2017). En *C. capitata*, hay controversia entre los estudios que abordan la relación entre la edad del macho y esperma transferido; mientras que Papanastasiou y col. (2011) no encuentra una relación directa entre ambos factores, Taylor y col. (2001) apunta a una reducción de la transferencia con la edad del macho y Costa y col. (2012) a un incremento del esperma transferido con la edad.

Otro de los factores que se ha relacionado en el proceso de transferencia de esperma es la duración de la cópula y su influencia se ha observado que es significativa en diversos insectos (Yamagishi y Tsubaki, 1990; Eberhard, 1996; Engqvist y col., 2007; Perez-Hedo y col., 2014; Himuro y Fujisaki, 2015). En los estudios realizados en *C. capitata*, se extrae la concordancia general de que la cantidad de esperma transferido aumenta con la duración de la cópula; sin embargo dicho incremento muestra un patrón que no se halla del todo claro sobre todo en cópulas más largas y a partir de un tiempo determinado (Farias y col., 1972; Seo y col., 1990; Yuval y col., 1996). Señalar también que se encuentran estudios en donde no se identifica una relación entre duración de cópula y transferencia de esperma (Taylor y Yuval, 1999; Taylor y col., 2000; Costa y col., 2012).

En los programas que usan la irradiación para la aplicación de la técnica del insecto estéril, es muy importante evaluar el efecto de dicha irradiación en la transferencia de esperma. Los machos irradiados deben ser capaces, sin verse comprometida su esterilidad, de transferir una cantidad apropiada de fluido espermático durante la cópula. Se ha visto claramente que la competitividad de los machos irradiados está inversamente relacionada con la dosis de irradiación, mientras que el nivel de esterilidad está, por supuesto, directamente relacionado con la dosis (Hooper, 1972, 1971). En varios estudios en *C. capitata* donde se compara la habilidad de inseminación de machos irradiados y no irradiados, se ha visto que el esperma almacenado en hembras acopladas con machos irradiados tiende a ser inferior que aquellas acopladas con machos de la misma cepa no irradiados o silvestres (Seo y col., 1990; Taylor y col., 2001; Mossinson y Yuval, 2003).

Aunque en conjunto la literatura sobre los factores relacionados con la transferencia y el almacenamiento de esperma en *C. capitata* parece ser amplia, hay brechas de conocimiento entre los diferentes estudios debido en algunos casos a la variabilidad en las cepas testadas y su experiencia sexual o la existencia de interacción entre factores como por ejemplo dieta e irradiación (Msaad Guerfali y Chevrier, 2020).

Por todo ello, y buscando arrojar luz sobre los factores que afectan la transferencia de esperma en este tefrítido en general, y en particular a la cepa Vienna-8 empleada en los programas TIE, en el presente capítulo se plantea como objetivo revisar los patrones de transferencia de esperma en dicha especie abordando en paralelo el efecto de la cepa, la edad y la duración de la cópula, y empleando el método de PCR cuantitativa en tiempo real previamente desarrollado y validado en el capítulo anterior para la cuantificación del esperma transferido.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Experimentos de acoplamiento

Los ensayos de acoplamiento se llevaron a cabo con individuos de *C. capitata* cepa silvestre y machos estériles cepa Vienna-8 procedentes de las colonias anteriormente descritas en el Capítulo 2 (apartado 2.2.1) e individualizados tal y como allí se detalla.

En el momento de la cópula se utilizaron hembras silvestres vírgenes con una edad de 4 días después de emergencia (DDE) y machos vírgenes de tres edades de madurez 4, 11 y 18 DDE de ambas cepas (silvestres y estériles Vienna-8). Todos los adultos, incluido los machos estériles Vienna-8, se mantuvieron por separado en cajas ventiladas de metacrilato transparente (20 × 20 × 20 cm) con agua y una dieta proteica (4:1 p:p, azúcar: levadura). Machos y hembras se dispusieron en cámaras climáticas distintas según sexo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de humedad relativa y 14:10 h (L:O), hasta el día del experimento.

Los apareamientos se realizaron en laboratorio empleando como arena experimental las jaulas de metacrilato transparente de 30 × 30 × 50 cm y bajo las mismas condiciones de temperatura, humedad y luz descritas en el apartado 2.2.2 del Capítulo 2. En cada una de las jaulas se liberaban en primer lugar 50 machos vírgenes de la misma cepa y edad, y transcurridos 10 minutos 50 hembras silvestres vírgenes. Cada vez que se formaba una pareja, se transfería con precaución a un tubo de ensayo anotando la hora de inicio del acople.

Para estudiar la evolución de la transferencia de esperma durante la cópula, se fijaron seis intervalos de tiempo (10, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos desde el inicio del acople) los cuales una vez alcanzados, los apareamientos se interrumpían. Las parejas se separaban físicamente con ligeros golpes una vez alcanzado uno de los tiempos de acople elegido al azar. Al cabo de una hora de la separación, periodo en el que se considera que el esperma transferido ha

migrado a las espermatecas, las hembras eran introducidas al congelador a -20°C y conservadas allí hasta que se procedía a la extracción de sus espermatecas.

Los experimentos se realizaron semanalmente hasta conseguir un mínimo de 35 hembras silvestres fertilizadas de las 30 combinaciones posibles de acoplamiento (2 cepas de machos x 3 edades de madurez x 6 tiempos de acople).

3.2.2. Aislamiento de espermatecas, extracción de ADN y PCR cuantitativa en tiempo real

El espermatozoides transferido a las hembras en las distintas combinaciones de acoplamientos se estimó a partir de los espermatozoides contenidos en sus principales órganos de almacenamiento, las espermatecas.

Para ello, se extirparon el par de espermatecas de cada hembra, y una vez aisladas se procedió a la extracción de su ADN total. El procedimiento seguido tanto para el aislamiento como para la extracción de ADN fue el mismo descrito en los apartados 2.2.3 y 2.2.4 del Capítulo 2.

De cada una de las extracciones de ADN, se estimó el número de células espermáticas aplicando la metodología PCR cuantitativa desarrollada y validada en este trabajo (Capítulo 2). Utilizando el par de marcadores CcYsp-dir y CcYsp-R2, diseñados para identificar una secuencia específica del cromosoma Y, se realizó un análisis PCR en tiempo real con el fluoróforo SYBR® Green y por interferencia con la curva de calibrado, se estimó la densidad media de espermatozoides en cada una de las muestras de ADN.

3.2.3. Análisis de datos

El efecto de los factores edad y cepa del macho (donante de espermatozoides) y tiempo de acoplamientos en los valores de detección y cantidad de espermatozoides obtenidos de la qPCR a tiempo real, así como su interacción, fueron evaluados mediante un análisis de la varianza (ANOVA multifactorial) aplicando el procedimiento de

la diferencia mínima significativa de Fisher LSD. Se realizó también un segundo análisis ANOVA de dos vías por separado para machos silvestres y estériles.

Los análisis estadísticos se realizaron con *Statgraphics ® Centurion XVI* (StatPoint Technologies Inc, 2010). Se consideró un resultado estadísticamente significativo cuando el P-valor fue menor a 0,001 con un intervalo de confianza del 95%. La normalidad de los datos fue evaluada utilizando el test Kolmogorov-Smirnov.

3.3. Resultados

3.3.1. Evaluación de la transferencia efectiva de esperma en los acoplamientos

Del total de hembras apareadas en los ensayos, se obtuvo el ADN de las espermatecas de 1.005 hembras y 981 fueron testadas mediante qPCR a tiempo real. En el 80,33% de las muestras evaluadas se detectó amplificación del fragmento del Cromosoma-Y objetivo, así que puede afirmarse que hubo transferencia efectiva de espermatozoides en tales apareamientos.

Al analizar la cantidad de muestras positivas en esperma según el origen del macho involucrado en el apareamiento, su edad y la duración del acople, se obtuvo un efecto significativo de las tres variables en cuanto a positividad se refiere ([Tabla C3.01](#)).

El porcentaje de detección de esperma fue del 86,63 % en las cópulas efectuadas con machos silvestres y del 69,27% en las cópulas con machos Vienna-8 estériles ($F_{1,981} = 52,07$; $P < 0,001$).

Debido a que la significación se detecta en los factores simples, pero no en la interacción entre estos, se realiza un nuevo análisis y se estudia para cada cepa por separado el efecto de la edad y el tiempo de acople.

En cuanto al efecto de la edad, en este segundo análisis por grupos, se observó que la edad del macho no tuvo una influencia significativa en el

porcentaje de detección de esperma en el caso de los machos silvestres ($F_{2,606} = 1,19$; $P = 0,306$) y en el caso de los machos Vienna-8 estériles, aunque hubo una menor detección en las muestras procedentes de las cópulas con los machos de mayor edad fisiológica (18 DDE), esta diferencia no llegó a ser significativa ($F_{2,375} = 2,52$; $P = 0,082$) (Tabla C3.02).

Con respecto a la duración del acople, la detección de esperma fue descendiendo al reducir los tiempos de acoplamiento (Tabla C3.03), siendo significativamente menor para ambas cepas en las cópulas de 10 minutos de duración (en machos silvestres $F_{5,606} = 23,05$; $P < 0,001$ y en estériles Vienna-8 $F_{5,375} = 7,67$; $P < 0,001$).

Tabla C3.01 | Efecto de los tres factores evaluados (procedencia del macho involucrado en el cruzamiento, su edad y el tiempo de acoplamiento) en la positividad de las muestras, Valores en negrita indican factor significativo ($P < 0,05$).

Factor	F	GI	P-valor
Cepa	52,07	1	<0,001
Edad	4,09	2	0,017
Tiempo	24,08	5	<0,001
Cepa*Edad	1,19	2	0,306
Cepa*Tiempo	2,03	5	0,072
Edad*tiempo	1,38	10	0,184

Tabla C3.02 | Porcentaje de muestras ($X \pm EE$) en las cuales se ha detectado esperma en función de la edad para cada tipo de cruzamiento. Las diferencias entre las letras en superíndice denotan diferencias significativas según las edades de madurez de los machos (análisis de la varianza, $P < 0,001$).

Edad fisiológica del macho	Cepa silvestre	Cepa V8 estéril
4	89,45 \pm 2,00	77,30 \pm 3,54 ^a
11	82,63 \pm 2,76	66,94 \pm 4,29 ^{ab}
18	87,15 \pm 2,51	63,72 \pm 4,54 ^b

Tabla C3.03 | Porcentaje de muestras ($X \pm EE$) en las cuales se ha detectado esperma en función del tiempo de acoplamiento para cada tipo de cruzamiento. Las diferencias entre las letras en superíndice denotan diferencias significativas entre los tiempos de acoplamiento en cópulas con machos cepa silvestre (minúsculas) y machos cepa Vienna-8 estériles (mayúsculas) (análisis de la varianza, $P < 0,001$).

Tiempo de acople (minutos)	Cepa silvestre	Cepa V8 estéril
10	58,25 ± 4,88 ^a	42,31 ± 6,92 ^A
30	80,37 ± 3,86 ^b	66,67 ± 5,99 ^{AB}
60	94,00 ± 2,39 ^c	61,97 ± 5,80 ^{BC}
90	94,95 ± 2,21 ^c	73,33 ± 5,14 ^{BC}
120	96,19 ± 1,88 ^c	85,33 ± 4,11 ^c
150	97,83 ± 1,53 ^c	89,74 ± 4,92 ^c

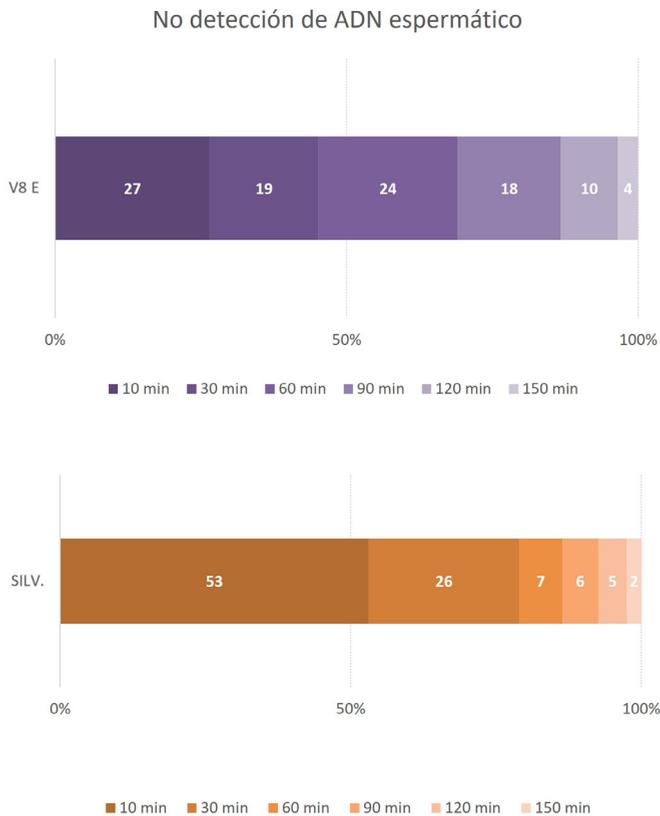


Figura C3.01 | Distribución relativa de las muestras negativas (no detección de espermatozoides) en función del tiempo de acoplamiento para cada tipo de cruzamiento (SILV.: con machos silvestres; V8 E: con machos Vienna-8 estériles).

Así pues, las muestras procedentes de cópulas de 10 y 30 minutos concentraron el 79,01% de las no detecciones de espermatozoides en el caso de los acoplamientos con silvestres, mientras que en los acoplamientos con Vienna-8 estériles, el 68,75 % de las no detecciones tuvo lugar en las cópulas de menos de 60 minutos (Figura C3.01).

3.3.2. Cuantificación relativa del esperma transferido en los acoplamientos.

El análisis cuantitativo realizado a las muestras positivas en esperma (en total 788) mediante el método qPCR a tiempo real y la curva estándar puso de manifiesto diferencias en cuanto a la cantidad relativa de espermatozoides transferido a las hembras durante los acoplamientos. Dichas diferencias resultaron significativas para las variables cepa ($F_{1,788} = 43,09$; $P < 0,001$) y tiempo de acoplamiento. ($F_{5,788} = 7,18$; $P < 0,001$), resultando también significativa la interacción entre ellas ($F_{5,788} = 4,82$; $P < 0,001$), de modo las diferencias entre las cantidades de esperma transferido debidas a la duración del acople fueron distintas según la cepa del macho. Con respecto a la madurez del macho, no se obtuvo un efecto significativo en la cantidad de esperma transferido entre las tres edades evaluadas ($F_{2,788} = 0,05$; $P = 0,951$).

Se realizó un nuevo análisis sin introducir el factor edad del macho para estudiar la influencia de la cepa y el tiempo de acoplamiento en la cantidad de esperma transferido, así como la interacción significativa entre ellas. En el gráfico de interacción representado con los intervalos Tukey HSD se muestra el efecto del tiempo en el incremento de gametos transferidos, observándose un aumento progresivo pero diferente según la cepa, siendo esta diferencia significativa a partir de los acoplamientos de más de 90 minutos (Figura C3.02).

Al evaluar en detalle la cantidad de espermatozoides transferidos a las hembras en función del tiempo de cópula para cada cepa, se desprende que, aunque hay transferencia efectiva de esperma en los primeros 30 min de la cópula, la cantidad del esperma transferido resulta basal y a partir de los 60

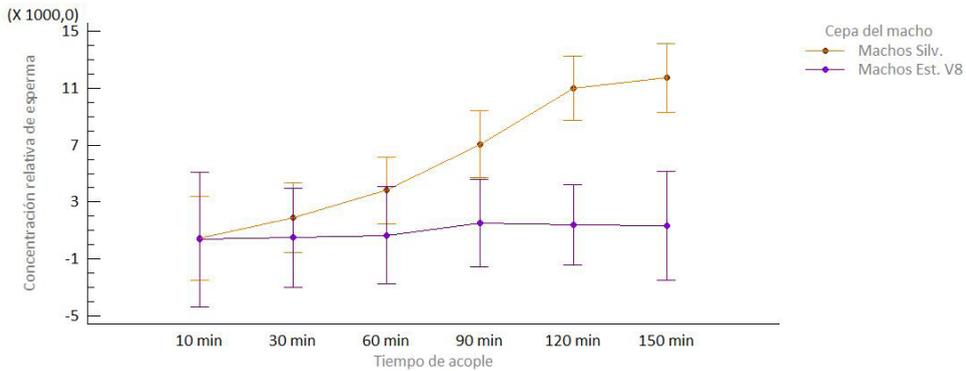


Figura C3.02 | Gráfico de interacción entre la concentración relativa media de espermatozoides encontrada en espermatecas de hembras apareadas con machos silvestres ó Vienna-8 estériles y la duración del acople.

minutos aumenta progresivamente hasta los 120 minutos, donde se alcanza un valor máximo que no difiere significativamente al incrementar el tiempo de acoplamiento. Si bien se observa una tendencia análoga para las dos cepas, de machos evaluadas, las cantidades relativas de gametos transferidos fueron más elevadas a partir de los 60 minutos en las cópulas producidas con machos silvestres (Figura C3.03 y C3.04).

A la vista de las figuras anteriores, se consideró interesante buscar un modelo para describir el proceso de transferencia efectiva de espermatozoides recibidos por la hembra según la duración del acople. Para ello se compararon varios modelos de regresión simple con las concentraciones medias relativas de espermatozoides obtenidas para cada tiempo de acople y cepa del macho evaluada (Tabla C3.04 y Tabla C3.05). El ajuste más adecuado resultó el modelo Multiplicativo en los acoples con los machos silvestres y el modelo Log-Y Raíz cuadrada-X con los Vienna-8 estériles.

Estos modelos ponen de manifiesto, que la cantidad de espermatozoides recibido por las hembras durante una cópula, tanto si esta tiene lugar con machos silvestres como estériles, está positivamente relacionada con el tiempo de duración del

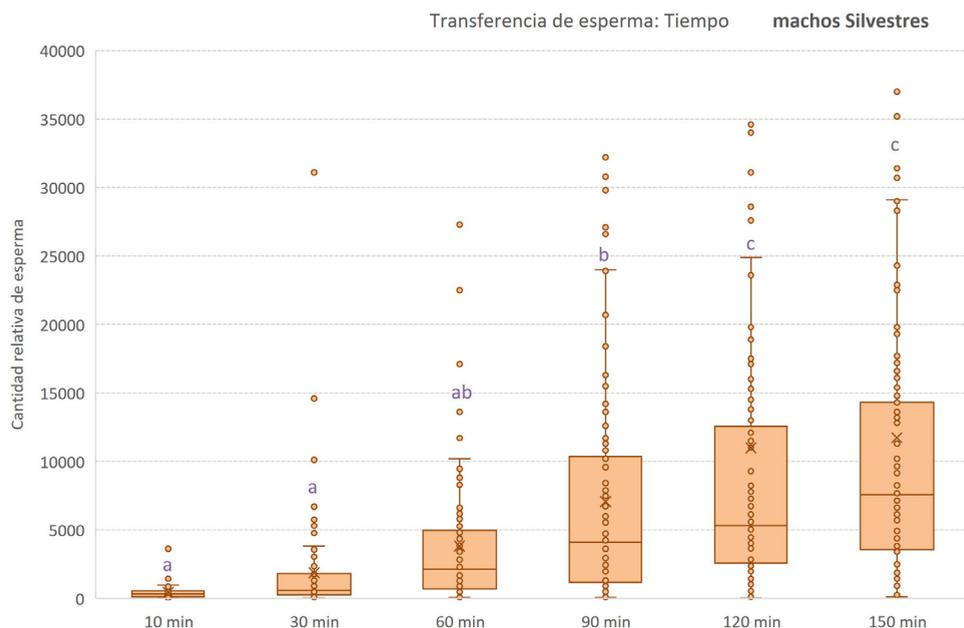


Figura C3.03 | Cantidad relativa de espermatozoides transferido en cópulas con machos silvestres (N° copias del gen objetivo cromosoma Y/ μ l/hembra) y almacenado en las espermatecas de las hembras para los diferentes tiempos de acoplamiento evaluados.

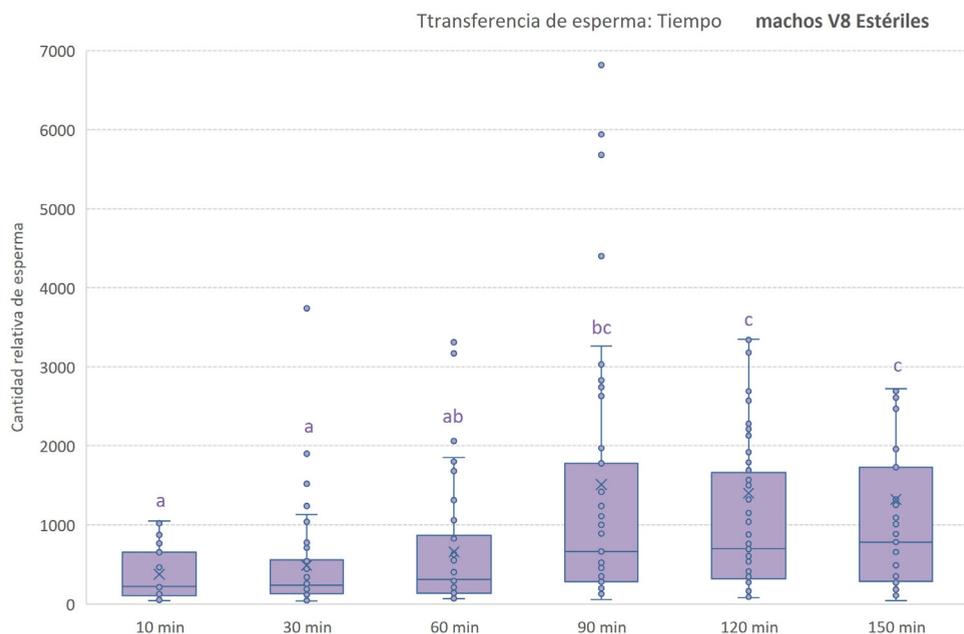


Figura C3.04 | Cantidad relativa de espermatozoides transferido en cópulas con machos estériles Vienna-8 (N° copias del gen objetivo cromosoma Y/ μ l/hembra) y almacenado en las espermatecas de las hembras para los diferentes tiempos de acoplamiento evaluados.

Tabla C3.04 | Modelos de regresión simple analizados para determinar la relación de la cantidad de esperma transferido por los machos silvestres (C) en función del tiempo de acople (T).

Machos Silvestres			
Modelo	Ecuación	P	R ²
Logaritmo de X	$C = a + b \cdot \ln(T)$	0,0101	84,06
Exponencial	$C = \exp(a + b \cdot T)$	0,0070	86,67
Log Y raíz cuadrada doble	$C = \exp(a + b \cdot \sqrt{T})$	0,0007	95,58
Lineal	$C = a + b \cdot T$	0,0002	97,75
Raíz cuadrada doble	$C = (a + b \cdot \sqrt{T})^2$	0,0001	98,83
Doble inverso	$C = 1 / (a + b/T)$	<0,0001	99,48
Multiplicativa	$C = \exp(a + b \cdot \ln(T))$	<0,0001	99,57

Tabla C3.05 | Modelos de regresión simple analizados para determinar la relación de la cantidad de esperma transferido por los machos Vienna- 8 estériles (C) en función del tiempo de acople (T).

Machos V8 estériles			
Modelo	Ecuación	P	R ²
Logaritmo de X	$C = a + b \cdot \ln(T)$	0,0242	75,70
Lineal	$C = a + b \cdot T$	0,0218	76,89
Doble inverso	$C = 1 / (a + b/T)$	0,0177	79,09
Exponencial	$C = \exp(a + b \cdot T)$	0,0125	82,31
Raíz cuadrada doble	$C = (a + b \cdot \sqrt{T})^2$	0,0103	83,90
Multiplicativa	$C = \exp(a + b \cdot \ln(T))$	0,0082	85,62
Log Y raíz cuadrada doble	$C = \exp(a + b \cdot \sqrt{T})$	0,0061	87,48

acople, y que este incremento no se mantiene en el tiempo de forma constante. En ambas la transferencia crece lentamente, pero en el caso de los machos silvestres, dicha transferencia es más progresiva y crece más al incrementar el tiempo de cópula. (Figura C3.05 y C3.06). Estos ajustes no lineales, pueden ser linealizados al aplicar el logaritmo a ambas variables, el tiempo de acople (T) y la concentración de esperma (C), quedando las ecuaciones de dichos modelos

como siguen:

- $\ln(C) = 3,27 + 1,24 * \ln(T)$ en la cepa silvestre ($P < 0,001$; $R^2 = 99,57\%$)
- $\ln(C) = 5,39 + 0,16 * \text{Raíz}(T)$ en la cepa V8 estéril ($P = 0,0061$; $R^2 = 87,48\%$)

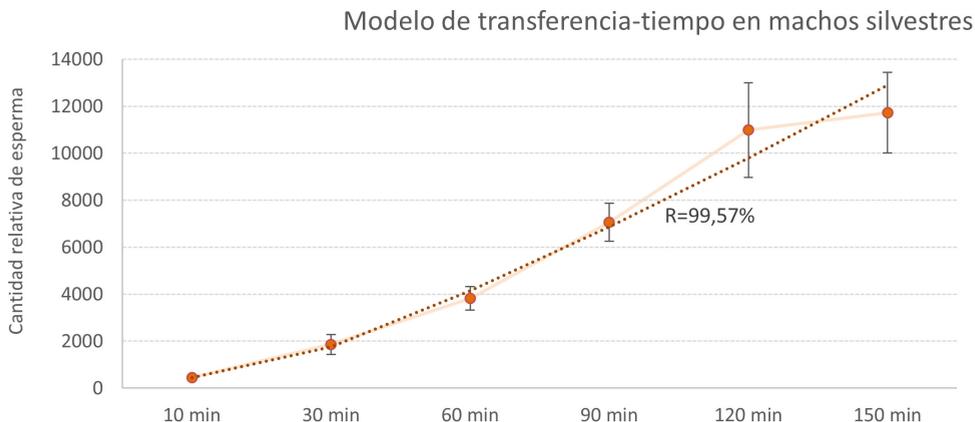


Figura C3.05 | Gráfico del modelo ajustado para los acoplamiento con machos silvestres $C = \exp(3,27 + 1,24 * \ln(T))$ (línea discontinua). Los puntos representan las concentraciones medias relativas de esperma (N.º copias del gen objetivo cromosoma Y/ μ l/hembra) obtenidas de las espermotecas para cada tiempo de acople. Las barras verticales indican los errores estándar.

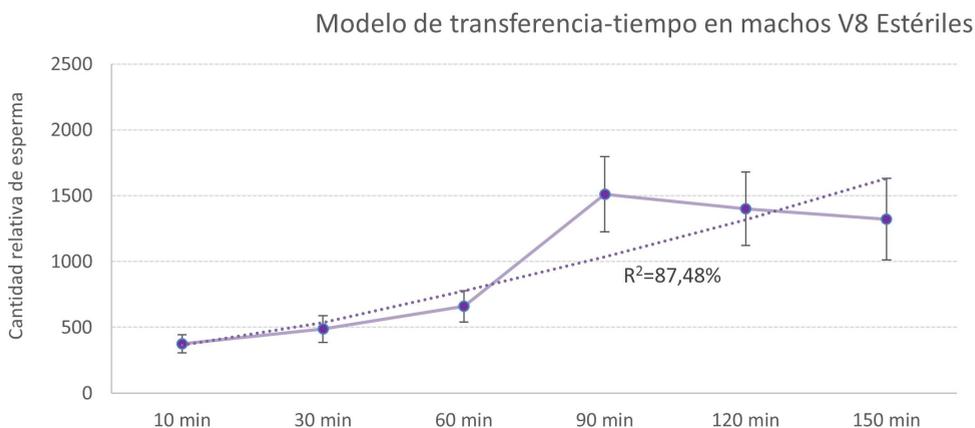


Figura C3.06 | Gráfico del modelo ajustado para los acoplamiento con machos Vienna-8 estériles $C = \exp(5,39 + 0,16 * \text{Raíz}(T))$ (línea discontinua). Los puntos representan las concentraciones medias relativas de esperma (N.º copias del gen objetivo cromosoma Y/ μ l/hembra) obtenidas de las espermotecas para cada tiempo de acople. Las barras verticales indican los errores estándar.

3.4 Discusión

Fertilidad de las cópulas

Cierto grado de infertilidad en las poblaciones naturales es más común de lo que generalmente se supone, y en el grupo de los insectos no es una excepción (Buxton, 1955; Choe, 1995; Qazi y col., 1996; García-González, 2004). El valor medio de cópulas concluidas sin inseminación se sitúa en algunos tefritidos como *Bactrocera tryoni* entre el 3 y 11% (en apareamientos naturales no interrumpidos) (Harmer y col., 2006; Perez-Staples y col., 2007; Radhakrishnan y col., 2009; Pérez-Staples y col., 2010; Shadmany y col., 2021) y en *Anastrepha fraterculus* del orden del 7 % (Abraham y col., 2011b). En el caso de *C. capitata*, algunos estudios apuntan a fallos frecuentes de inseminación, no detectándose espermatozoides después de la cópula entre el 20 y 38% de las hembras (tanto separadas espontáneamente como interrumpidas) (Camacho, 1989; Seo y col., 1990). En otras experiencias, sin embargo, se hace referencia a fallos en la inseminación menos frecuentes, situándose el grado de infertilidad por debajo del 7% (Wong y col., 1984; Whittier y Kaneshiro, 1995;), aunque cabe señalar que en estos casos se evaluaron en su mayoría cópulas no interrumpidas y de larga duración (más de 100 minutos). Los resultados del presente estudio confirman lo reportado en *C. capitata*, que no todas las cópulas producidas entre individuos de esta especie pueden ser exitosas con lo que respecta a la transferencia de espermatozoides.

La proporción promedio de cópulas sin transferencia de espermatozoides varió según la cepa del macho involucrada entre el 13% en el caso de los apareamientos con machos silvestres y el 31% en los estériles Vienna-8, pero no se observó que la edad de los machos para cada cepa afectara de manera significativa a la cantidad de cópulas con inseminación efectiva. Los apareamientos detectados sin transferencia fueron mayores en los tiempos de apareamiento más cortos de manera que el 50 % de éstas correspondieron a cópulas de 10-30 minutos. Esta proporción es similar a la reportada por Seo y col. (1990) donde el mayor número de no inseminaciones se detectan en los primeros 30 minutos del acople tanto en cópulas naturales no interrumpidas

como en separadas. Cabe señalar también que, en tales rangos de tiempo, debido a que el número de espermatozoides podía ser aún bajo, algunas muestras se situaban en los límites de detección del método de cuantificación.

Con la duración del acoplamiento, la proporción de cópulas con inseminación fue incrementando del 58% en las cópulas más cortas (10 minutos) hasta situarse por encima del 96% en los apareamientos más largos (120 y 150 minutos) en cópulas involucradas con machos silvestres, y del 42% al 85% con machos estériles Vienna-8. Dichos valores están en concordancia con los obtenidos por Seo y col. (1990) que indicaban que en apareamientos de 15 minutos había inseminación en el 51% de las cópulas con machos no irradiados y en el 37 % con machos irradiados, y a partir de los 120 minutos, las cópulas fértiles incrementaban hasta situarse por encima del 83% en ambos machos, encontrándose también por tanto cópulas de más de 120 minutos sin transferencia de esperma.

Con ello, se confirma que aunque el macho empieza la transferencia en los primeros minutos de la intromisión del edeago, los espermatozoides no se transfieren tan rápido durante la cópula como ocurre en otros dípteros como por ejemplo en *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae) que puede haber completado la transferencia de esperma en apenas 8 minutos (Gilchrist y Partridge, 2000) o como en *Anastrepha ludens* y *A. obliqua*, donde se registra que prácticamente el 100% de las hembras han sido inseminadas a partir de los 10 minutos de iniciarse la cópula (Pérez-Staples y col., 2014). Sin embargo, en otras especies del género *Anastrepha*, como *A. spatulada*, se ha observado que la velocidad de transferencia es menor, no encontrándose esperma en las hembras en los primeros 20 minutos de cópula (Pérez-Staples y col., 2014).

Abundancia del esperma transferido

En cuanto a la cantidad del esperma transferido, en los acoplamientos con machos estériles Vienna-8, las hembras acumularon menos esperma, quedando

más acentuada esta diferencia en las cópulas de mayor duración. Seo y col., (1990) también detectó en cepas de laboratorio de *C. capitata* en Hawái, que la inseminación con machos irradiados (150 Gy) había sido inferior que con los no irradiados; sin embargo, hay que tener en cuenta que las dosis de irradiación a las que habían estado expuestos dichos machos se encuentran entre las máximas empleadas en los dípteros de 100-150 Gy (Bakri y col., 2005).

Si bien el presente trabajo no está enfocado en evaluar la eficacia del programa TIE ni la capacidad de los machos liberados, sino en desarrollar un método para conocer mejor el proceso de la transferencia de espermatozoides durante las cópulas, a la vista de los resultados obtenidos, se confirma la necesidad de profundizar en el estudio entre esterilidad, competitividad y fertilidad, lo cual hasta la fecha no ha sido abordado con detalle en *C. capitata* (Bakri y col., 2005; Parker y Mehta, 2007). Un ejemplo de ello es que no hay muchos estudios que relacionen dosis de irradiación y espermatozoides transferidos (Zumreoglu y col., 1979; M'saad Guerfali y col., 2011), o del efecto de la dosis de irradiación en la tasa de espermatogénesis en los testículos y la producción de espermatozoides no funcionales (Elelimy y col., 2024). Hamdem y col. (2013) evaluando el efecto de una dieta larval enriquecida con bacterias probióticas (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. y *Citrobacter freundii*) en machos estériles de *C. capitata* cepa Vienna-8 (irradiados a 110 Gy de Co-60, dos días antes de su emergencia) cuya microbiota intestinal había sido alterada por la irradiación, encontraron que la cantidad de espermatozoides transferidos por los machos irradiados fue significativamente mayor en aquellos machos criados sobre dieta larval probiótica.

En nuestro estudio, además hay que indicar que junto al efecto de la irradiación a la que fueron sometidos los individuos Vienna-8 para su esterilización se suma el efecto de las condiciones de cría de un proceso masivo de un programa TIE, con lo cual sería interesante en futuras experiencias abordar tales factores independientemente. Otra cuestión a tener en cuenta es el hecho de que en este trabajo se estima la cantidad de espermatozoides almacenados en las espermatecas,

así pues teniendo en cuenta que los espermatozoides no se transfieren directamente a las espermatecas sino que deben llegar a ellas, sería interesante también explorar aspectos como la morfología de los espermatozoides en los machos Vienna-8 irradiados y posibles morfoanomalías que pudieran afectar a su movilidad, así como también la concentración espermatozoides en el fluido espermático y demás secreciones producidas por las glándulas accesorias del macho.

Con respecto a la edad de los machos y la cantidad de esperma recibido por las hembras durante las cópulas, no se identificó para el rango de edades evaluadas (de 4 a 18 DDE) una disminución del número de espermatozoides transferidos en ninguna de las dos cepas. Esta situación coincide con la reportada por Papanastasiou y col. (2011) los cuales observaron que el envejecimiento no afectaba a la capacidad de los machos para transferir los espermatozoides, evaluando en este caso sólo la cepa silvestre e individuos de hasta 50 días de edad. Así mismo, Shelly y col. (2011) tampoco constató un efecto de la edad en la fecundidad y fertilidad de las hembras que habían copulado con machos cepa silvestre de entre 10 y 40 días de edad. Sin embargo, se encuentran otros estudios que difieren al respecto; Taylor y col. (2001) detectó un cierto declive en cuanto a la cantidad del esperma almacenado en las hembras con la edad del macho (en un rango de los 3 a los 11 días de edad), siendo los machos empleados en este estudio individuos estériles irradiados de la cepa Vienna-4. Por otro lado, Costa y col. 2012) observó un incremento positivo de la transferencia de esperma con la edad de los machos, siendo en este caso machos cepa silvestre y de edades comprendidas entre los 4 y 20 días de edad.

En el contexto TIE, el hecho de que los machos de mayor edad puedan transferir cantidades similares de esperma en comparación a los machos jóvenes, es una característica interesante. En los programas de liberación resulta valioso desde el punto de vista logístico poder manejar rangos de edad en los cuales los machos estériles no hayan perdido el potencial de transferencia. Aunque hay otros factores a considerar para que una cópula resulte exitosa, como la competitividad de cópula o la capacidad de recópula, la transferencia de esperma es clave en el

proceso de apareamiento y en este estudio se refuerza la idea de que los machos mayores de edad (hasta 18 DDE) pueden transferir con éxito los espermatozoides a las hembras, resultando las cópulas igual de efectivas en términos de transferencia.

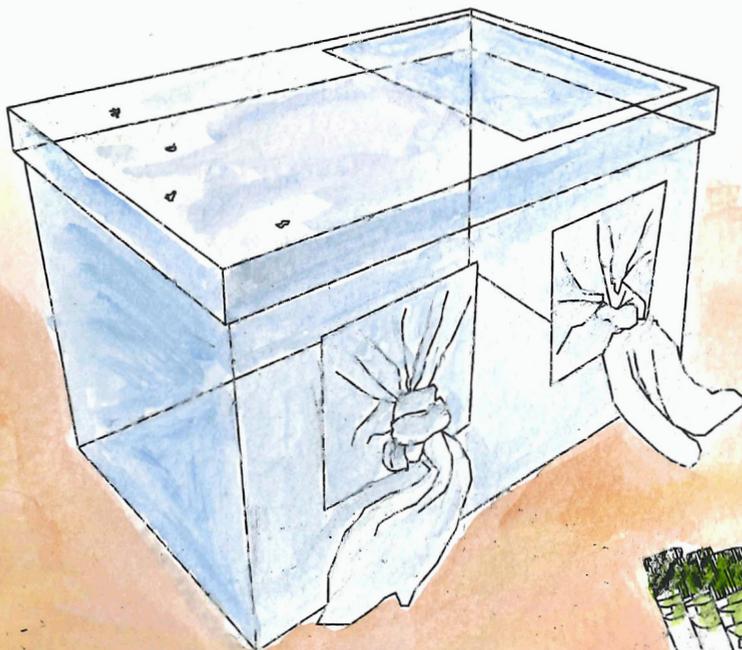
El efecto de la duración de la cópula en la cantidad de esperma almacenado por las hembras ha generado controversia entre los tefrítidos. En este estudio, el esperma transferido fue incrementando con el tiempo de acople, una relación positiva identificada tanto en las cópulas con machos silvestres como estériles y que coincide con la observada por Farias y col. (1972), Seo y col. (1990) y Yuval y col. (1996). Esta relación ha sido descrita en otros tefrítidos como en *Anastrepha suspensa* (Fritz, 2004), *A. lundens*, *A. obliqua*, *A. spatulata* (Pérez-Staples y col., 2014) y *Bactrocera tryoni* (Shadmany y col., 2021) aunque en algunos estudios no queda del todo clara como en *A. suspensa* (Harmer y col., 2006), *B. tryoni* (Perez-Staples y col., 2007; Collins y col., 2012) y *A. fraterculus* (Abraham y col., 2011a). Estas diferencias podrían deberse a cuestiones metodológicas como los rangos de tiempo evaluados o la exactitud de los métodos de cuantificación de esperma; por ejemplo, Collins y col., (2012) en *B. tryoni* no llega a encontrar una asociación entre duración de cópula y esperma almacenado en las hembras, pero sin embargo observa una relación entre duración de cópula y fertilidad relativa (proporción de huevos fértiles) en hembras que habían copulado dos veces con machos irradiados y no irradiados, método indirecto empleado también para estimar la transferencia de espermatozoides. De igual modo, en *C. capitata* también se encuentran discrepancias al respecto y parece que podría explicarse por los intervalos de tiempo evaluados en las experiencias. En este estudio se analiza la transferencia en cópulas interrumpidas a intervalos de tiempo entre los 10 y 150 min; hasta los 60 minutos las cantidades de esperma son menores y luego se produce un incremento que empieza a estabilizarse a partir de los 120 minutos, un patrón gradual no lineal que se encuentra también en los estudios de Farias y col. (1972) y Seo y col., (1990) en cópulas de entre 4 y 150 minutos (separadas natural o forzosamente) con machos cepa silvestre irradiados y no irradiados. Sin embargo, en los experimentos realizados por Taylor y Yuval (1999), Taylor y col. (2000) y Costa y col. (2012), en machos silvestres, y Taylor y col.

(2001), en machos Vienna-8/Tol94 estériles, en los que no encuentran una relación entre duración de la cópula y cantidad de esperma transferido, se evalúan cópulas no interrumpidas con duraciones mínimas de 110, 45, 42 y 70 minutos llegando a los 335, 318, 432 y 325 minutos respectivamente, siendo por tanto cópulas más extendidas. Shadmany y col. (2021), en su estudio de cuantificación de transferencia de esperma mediante PCR a tiempo real en *Bactrocera tryoni*, encuentra que el almacenamiento de esperma aumenta drásticamente con la duración de la cópula durante los primeros 40 minutos y luego se alcanza una meseta más allá de la cual un incremento adicional en la cópula no daría como resultado un aumento en el esperma almacenado. Esta relación es similar a la encontrada en este estudio, en la cual la transferencia parece estabilizarse entre los 90 y 120 minutos tanto en las cópulas con machos silvestres como en Vienna-8 estériles. Por tanto, y a la vista de estos resultados para la especie *C. capitata* se confirma que por debajo de un tiempo determinado (próximo a los 90 minutos) la duración de la cópula es determinante en la cantidad de esperma recibido por la hembra.

A pesar de que la evolución en el tiempo de la transferencia de esperma fue similar tanto en los apareamientos con machos silvestres y estériles, el aumento del número de espermatozoides recibidos por las hembras en relación con el tiempo de cópula fue menor en los apareamientos con estériles a partir de los 90 minutos de cópula, no observándose un incremento significativo en el intervalo de tiempo de 90 a 150 minutos en cuanto a espermatozoides se refiere, ya que otros componentes del fluido espermático como las proteínas SFPs (*seminal fluid proteins*) que no son cuantificadas en este método podrían ser transferidas. Este dato podría sugerir un posible agotamiento del esperma que tiene lugar en mayor rapidez que en el caso de los machos silvestres, circunstancia que ha sido reportada entre machos no irradiados e irradiados para la especie *Bactrocera cucurbitae* (Kuba y Itô, 1993) y *B. tryoni* (Radhakrishnan y col., 2009). Ante esta situación se plantea también la cuestión de si los machos estériles de este estudio serían capaces de reponer los suministros de esperma para futuras cópulas, análisis que se aborda en el capítulo siguiente del presente trabajo.

4

Recópula y transferencia de esperma en machos estériles



Capítulo 4

RECÓPULA Y TRANSFERENCIA DE ESPERMA EN MACHOS ESTÉRILES

4.1. Introducción

Ceratitis capitata es una plaga con un historial de rápida expansión e invasiones devastadoras (Malacrida y col., 2007). Su éxito reproductivo le ha permitido colonizar rápidamente nuevas áreas, y entre las características adaptativas sugeridas que han contribuido a ello, se encuentra el apareamiento múltiple, es decir el reapareamiento con más de una pareja potencial (Shelly y Whittier, 1993). Este fenómeno de apareamiento múltiple, acuñado en el caso de las hembras como poliandria y en el caso de los machos como poliginia (Gowaty, 2012), ha sido estudiado en las poblaciones naturales de *C. capitata* (McInnis, 1993; Kraaijeveld y col., 2005; Bonizzoni y col., 2006).

En los insectos, los patrones de receptividad femenina varían de la monogamia estricta a la poliandria extrema, con todas las variaciones posibles intermedias (Thornhill y Alcock, 1983). Con respecto a los tefrítidos, a excepción de algunos casos observados de monoandria como en *Anastrepha striata* (Schiner) o *Rhagoletotrypeta pastranai* (Aczél), las hembras se definen como poliándricas facultativas; una hembra puede estar ante un macho en particular y fácilmente decidir no reaparearse, incluso disponiendo de tiempo y oportunidad, o bien optar por volver a aparearse (Gavriel y col., 2009).

En *C. capitata*, la poliandria de las hembras se ha descrito en condiciones de laboratorio (Whittier y Shelly, 1993; Mossinson y Yuval, 2003; Gavriel y col.,

2009; Bertin y col., 2010; Scolari y col., 2014a), en condiciones de semi campo (Vera y col., 2003) y en hembras recolectadas en campo abierto (McInnis, 1993; Bonizzoni y col., 2002, 2006). Entre los factores sugeridos que actúan induciendo un nuevo apareamiento se citan la condición del macho, la duración de la cópula, la transferencia de espermatozoides y las secreciones de las glándulas accesorias masculinas (Mossinson y Yuval, 2003; Gavriel y col., 2009; Pérez-Staples y Abraham, 2023).

En la literatura se cita que el porcentaje de hembras de *C. capitata* que vuelven a recopular al menos una vez se sitúa entre el 5 y el 70% (Katiyar y Ramirez, 1970; Nakagawa y col., 1971; Whittier y Shelly, 1993; Blay y Yuval, 1997; Miyatake y col., 1999; McInnis y col., 2002; Shelly y Kennelly, 2002; Vera y col., 2002b; Mossinson y Yuval, 2003; Gavriel y col., 2009; Costa y col., 2012). Esta variación observada en el apareamiento múltiple en las hembras se ha atribuido a la metodología (por ejemplo, el empleo de jaulas de campo o de laboratorio con mayor o menor densidad de moscas) y a la influencia de otros factores como las cepas probadas, la edad de los individuos, la proporción de sexos o el estado nutricional. En un estudio a partir de muestras de campo en Israel y Grecia, se encontró que la propensión de reapareamiento en las hembras silvestres recolectadas se situaba entre 3,8% y 21% (Bonizzoni y col., 2002, 2006; Kraaijeveld y col., 2005).

Al igual que las hembras no son monógamas, y pueden reacoplarse y recibir el esperma de diversos individuos, también los machos son capaces de tener múltiples parejas. Se sabe que los tefrítidos machos se aparean repetidamente (Kuba y Itô 1993; Aluja y col., 2001; Pérez-Staples y Aluja 2004; Perez-Staples y Aluja 2006b; Aluja y col., 2008) pero casi todos los estudios de selección sexual y aptitud reproductiva en tefrítidos han centrado su enfoque en machos vírgenes (Radhakrishnan y col., 2009).

La recópula de machos de *C. capitata* se encuentra poco documentada en comparación con las hembras. Nakagawa y col. (1971) estudió la frecuencia

de apareamiento de este tefrítido en condiciones de laboratorio y encontró que los machos se apareaban repetidamente considerándolos como polígamos. Un estudio en jaulas de campo dirigido a evaluar de forma individualizada el comportamiento de apareamiento entre cepas de laboratorio irradiadas y moscas silvestres criadas en café, también registró tendencias de apareamiento repetitivo tanto en machos como en hembras (McInnis y col., 2002).

Por otro lado, el potencial reproductivo de los machos está condicionada por la espermatogénesis, y su éxito en la fertilización va a depender de la capacidad de reponer la eyaculación entre apareamientos (Dewsbury, 1982; Wedell y col., 2006). La capacidad de mantener el suministro de gametos de algunos dípteros macho está muy limitada cuando se aparean en rápida sucesión, tal es el caso del mosquito *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) (Jones, 1973) o de la mosca de la oveja australiana *Lucilia cuprina* Wied. (Diptera: Calliphoridae) (Smith y col., 1990).

En el caso de los machos esterilizados, sus espermatoцитos primarios junto con las espermatogonias primarias y secundarias son dañadas durante la irradiación, pero sobreviven las espermátidas y los espermatozoides (más detalles en el Capítulo 1 apartado 1.3.4). La atrofia de los tejidos germinales va a generar que los machos irradiados tengan poca o ninguna capacidad según la dosis de irradiación recibida para la espermatogénesis, lo cual sugiere una aspermia a través del agotamiento de los espermatozoides después de diversos apareamientos (Itô y Yamagishi, 1989; Kuba y Itô, 1993; Radhakrishnan y col., 2009).

La poliandria en las hembras ha sido considerada como una variable que puede comprometer la efectividad de los programas de TIE (Kraaijeveld y Chapman, 2004; San Andrés y col., 2007; Pérez-Staples y col., 2013; Dyck y col., 2021). Sin embargo, la capacidad de los machos estériles para volver a aparearse e inseminar hembras silvestres en relación con el efecto potencial en los programas TIE nunca se ha abordado en detalle. En este capítulo, se investiga la capacidad de los machos estériles Vienna-8 para volver aparearse cuando se

les ofrece múltiples oportunidades, cuantificando también la transferencia de esperma que se produce en estos acoples.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Experimentos de recópula

Para evaluar la tendencia a la recópula de los machos estériles se realizaron ensayos secuenciales de apareamiento.

Los ensayos se llevaron a cabo con individuos de *C. capitata* cepa silvestre y machos estériles cepa Vienna-8 procedentes de las colonias descritas en el Capítulo 2 (apartado 2.2.1). Tanto los adultos silvestres como los machos estériles Vienna-8, se dispusieron por separado en cajas ventiladas de metacrilato transparente (20 × 20 × 20 cm) con agua y una dieta proteica (4:1 p: p, azúcar: levadura). Machos y hembras se mantuvieron en cámaras climáticas distintas según sexos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de humedad relativa y 14:10 h (L:O) durante la duración del experimento.

Cada experimento comenzaba con una primera prueba de apareamiento (día 1) en la que se colocaban hembras silvestres y machos estériles, ambos vírgenes y de la misma edad (4 días de edad al inicio del experimento y sexualmente maduros) en jaulas de metacrilato (30 x 30 x 50 cm; volumen 45 l) con dos aberturas de malla (14 x 14 cm) en proporción sexual 1:1 (unidad de apareamiento). Cada unidad de apareamiento constaba de 100 moscas/ jaula con una proporción de sexos de 1:1. Las moscas fueron monitoreadas durante dos horas ya que, por las condiciones ambientales y la madurez sexual de los individuos utilizados, la mayor parte de los apareamientos ocurrían dentro de este intervalo de tiempo. Cada vez que se producía un acople, la pareja se recogía cuidadosamente en un tubo de ensayo de plástico (poliestireno; 12 mm de diámetro x 75 mm de alto; volumen aproximado de 5 ml), se registraba el tiempo de inicio de la cópula y se mantenía durante 100 minutos, periodo de tiempo considerado como acoplamiento exitoso (tal y como se ha podido demostrar en el capítulo 3, más del 90% del esperma total transferido a las hembras durante

la cópula se adquiere en este intervalo de tiempo).Trascurrido ese periodo, las parejas se separaban cuidadosamente sacudiendo suavemente los tubos con cuidado de no dañar las estructuras genitales.

Todos los machos estériles que se aparearon con éxito en esta primera cópula fueron guardados para su reutilización en la secuencia planificada de ensayos de recópula que se describe a continuación. Los machos que quedaron dentro de la jaula sin aparearse, así como las parejas cuyo acople duraba menos de 100 minutos, fueron descartados. Como control de calidad de las hembras silvestres empleadas en el experimento, en este primer día de cada réplica se realizó una prueba de apareamiento con machos y hembras silvestres. Las parejas de apareamiento fueron recolectadas y registradas con el mismo procedimiento que el descrito para las jaulas con machos estériles. Los datos de estos apareamientos con machos silvestres y estériles se utilizaron para verificar que estas tasas de apareamiento estuvieran por encima del 50 %, como lo recomienda la (FAO/IAEA/USDA, 2019) para validar este tipo de pruebas.

Las pruebas de recópula consistieron en ofrecer hembras silvestres vírgenes a los machos estériles que copularon el día 1 hasta en cuatro ocasiones: a las 24 h, 48 h, 4 días y 7 días después del primer apareamiento (Figura C4.01). Durante un período de observación de dos horas, las parejas de cada una de las unidades de apareamiento fueron aisladas en tubos de ensayo de plástico. Se registró el inicio de la cópula y la interrupción después de 100 minutos como se describe anteriormente para el primer apareamiento. Al final de cada prueba, los machos se separaban según la respuesta, reacoplados o no, y posteriormente se reutilizaban para la siguiente ronda de ensayos de apareamiento.

Se realizaron once réplicas a lo largo de 18 meses, con al menos 3 unidades de apareamiento (dependiendo de la disponibilidad de observadores) en la primera prueba de apareamiento en cada una de ellas. Se utilizaron un total de 3.979 machos estériles como punto de partida, de los cuales 2.222 machos estériles

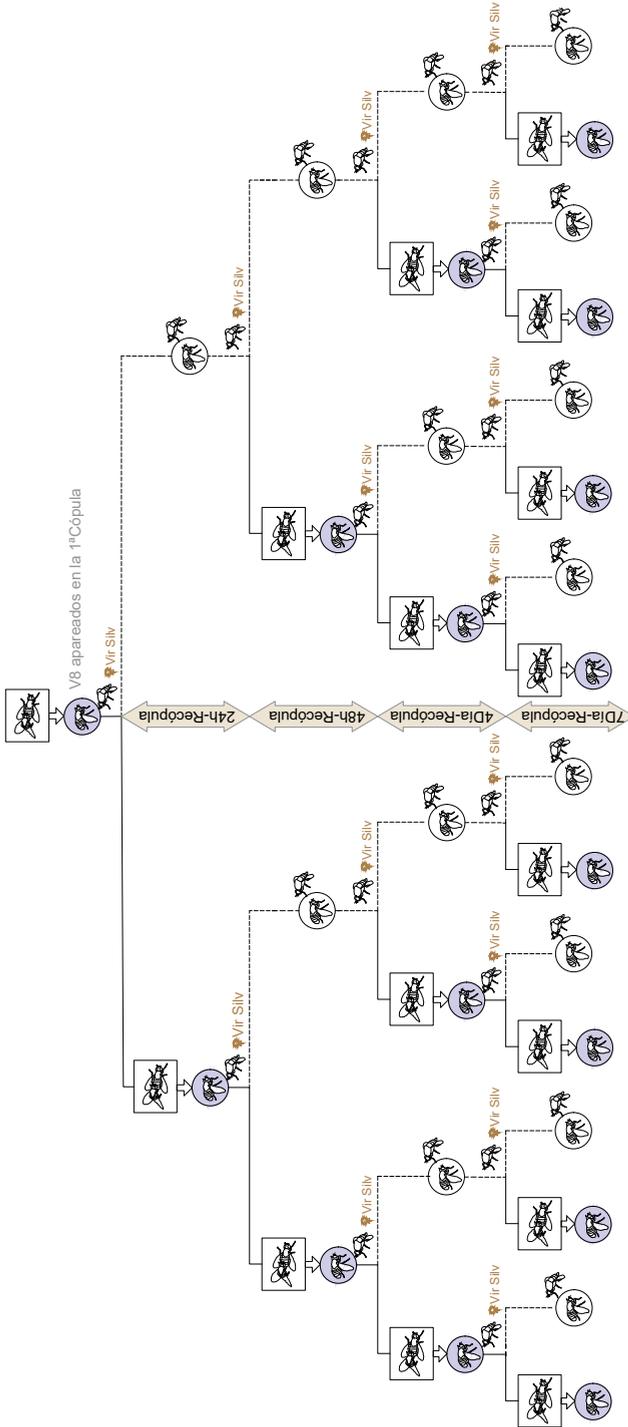


Figura C4.01 | Representación esquemática del diseño experimental. Los machos Vienna-8 (V8) estériles apareados de una primera cópula fueron el punto de partida para los ensayos de reemplazamiento establecidos de la siguiente manera. Se ofrecieron hembras (vírgenes cepa silvestre) (♀Vir Silv) a las 24 h, 48 h, 4 días y 7 días después de la primera cópula. Los machos Vienna-8 se mantuvieron separados según su respuesta (acoplados: círculos azules o no apareados: círculos blancos) hasta el último ensayo. Las hembras apareadas (cuadrados) se conservaron para analizar los espermatozoides contenidos en sus espermatotecas mediante PCR en tiempo real. Todos los ensayos se realizaron en condiciones de laboratorio y dentro de jaulas de metacrilato de 48 l con una proporción de sexos de 1:1 y una densidad máxima de 100 moscas/jaula. Se probaron moscas cuando tenían entre 4 y 11 días de edad.

copularon en el día 1 y pasaron a formar parte de la secuencia de recópulas. En la [figura C4.02](#) del apartado resultados, se muestra el número de machos estériles que quedaron en conjunto de cada etapa de recópula. Se estableció un sistema de trazabilidad para asegurar el estatus de reacople de cada macho (cantidad de veces y en qué momentos el macho había vuelto a aparearse). En total, dependiendo de la respuesta del macho al apareamiento múltiple, fueron posibles 16 combinaciones experimentales para las cuatro ocasiones de recópula ofrecidas.

Las hembras silvestres vírgenes utilizadas en cada prueba de apareamiento, eran de la misma edad que los machos estériles (desde los 4 días hasta los 11 días al final del experimento). Dentro de este intervalo de edad, se considera que tanto los machos como las hembras tienen una madurez sexual similar (Arita, 1982). Todas las pruebas de apareamiento se realizaron por la mañana (de las 10 a las 14 horas según la época del año) y en condiciones ambientales de laboratorio a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, 40%–50% de humedad relativa y luz natural procedente de una ventana (intensidad lumínica de 600 ± 100 luxes).

4.2.2. Cuantificación del esperma transferido

Para analizar la abundancia del esperma transferido después de cada recópula, las hembras procedentes de dichos apareamientos se conservaron a -20°C una hora después del momento de la separación, para dar tiempo a la llegada de los espermatozoides a las espermatecas (tiempo fijado según las observaciones recogidas en el apartado 2.2.2 del Capítulo 2). Cuando el número de hembras disponibles era alto, se seleccionaban al azar 15 hembras. Cada hembra se preservaba de forma independiente en un tubo de ensayo y se registraba el estatus de reacople del macho con el que se había apareado. En total se diseccionaron y analizaron un mínimo de 20 hembras por combinación experimental. El aislamiento de las espermatecas y la extracción de ADN se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en los apartados 2.2.3 y 2.2.4 del Capítulo 2.

La abundancia de espermatozoides transferidos y almacenados en las dos espermatecas de las hembras se estimó mediante PCR cuantitativa absoluta en tiempo real según la metodología desarrollada y validada en este trabajo (Capítulo 2). Utilizando el par de marcadores CcYsp-dir y CcYsp-R2, diseñados para identificar una secuencia específica del cromosoma Y, y el fluoróforo SYBR®Green, se obtuvo la densidad media de espermatozoides en cada una de las muestras de ADN por interferencia con la curva de calibrado.

La cuantificación y el análisis de datos se llevaron a cabo con el sistema LightCycler® 480 Real-Time PCR Roche y su software asociado. Los marcadores de identificación del cromosoma Y (CcYsp-dir y CcYsp-R2), los materiales estándar para generar la curva de calibración, el *master mix* y las condiciones de amplificación fueron las mismas que se utilizaron en los experimentos anteriores.

4.2.3. Análisis de datos

La capacidad de recópula de los machos Vienna-8 estériles se cuantificó mediante la frecuencia relativa condicionada de apareamiento al final de cada prueba de cópula; estas frecuencias se representaron gráficamente en un diagrama de árbol. La capacidad de volver a copular en varias ocasiones (entre 1 y 2 ó 3 más) y ninguna después de la primera cópula fue analizada utilizando una de tabla de contingencia mediante la prueba de χ^2 .

Los valores de abundancia relativa de espermatozoides transferidos en los diversos apareamientos se obtuvieron utilizando el *LightCycler® 480 Software Package versión 1.5* (Roche Diagnostics) a partir de los valores umbral de número de ciclos (Ct) de las muestras calculados mediante el método cuantitativo absoluto por segunda derivada máxima y la curva estándar obtenida por el software. A partir de las concentraciones obtenidas de este análisis se determinó el porcentaje de muestras positivas en esperma, codificando como 0 (negativas) y 1 (positivas) las muestras según el valor umbral de detección establecido en el ensayo.

Las concentraciones relativas de espermatozoides obtenidas mediante el método PCR a tiempo real de los machos con el comportamiento de apareamiento más frecuentes fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) aplicando el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fisher LSD para evaluar la transferencia de esperma en los diferentes reapareamientos.

Los análisis estadísticos se realizaron con *Statgraphics*® *Centurion XVI* (StatPoint Technologies Inc, 2010). Se consideró un resultado estadísticamente significativo cuando el P-valor fue menor a 0,05 con un intervalo de confianza del 95%. La normalidad de los datos fue evaluada utilizando el test Kolmogorov-Smirnov. Las moscas que murieron o resultaron dañadas por la manipulación durante el experimento no fueron incluidas en el análisis.

4.3. Resultados

4.3.1. Respuesta de reapareamiento de los machos estériles

Las tasas de apareamiento en las primeras cópulas se situaron en todos los experimentos por encima del valor 0,50 (FAO/IAEA/USDA, 2019) con lo que las condiciones de los individuos fueron consideradas aptas para iniciar los ensayos secuenciales de recópula. Dichas tasas promedio de apareamiento fueron del $0,67 \pm 0,06$ en los cruces entre machos y hembras silvestres (control) y de $0,64 \pm 0,02$ entre machos estériles y hembras silvestres, considerando como un apareamiento válido si presentaba la duración mínima establecida en el procedimiento experimental de 100 minutos.

La respuesta de los machos estériles después de la primera cópula resultó positiva, recopulando más de una vez a lo largo de los ensayos secuenciales. El número de estos reacoplamientos se expresó como frecuencias relativas condicionales en un diagrama de árbol (Figura C4.02). Cada ramal ilustra la frecuencia relativa condicional, es decir, la proporción de machos con una respuesta particular de reapareamiento asociado a la proporción de la respuesta que le precede durante la serie del ensayo.

Así pues, se observa que el 73% de los machos estériles se volvieron a aparear 24 horas después de la primera cópula y aproximadamente el 40% llegó a reaparearse hasta en las tres pruebas consecutivas de 24 horas, 48 horas y 4 días desde la primera cópula. La proporción de machos que recopularon hasta en tres ocasiones con independencia del momento temporal representó el 56 % y aquellos que llegaron a aparearse en las cuatro ocasiones posibles ofrecidas representaron el 24%.

El árbol de frecuencias reveló que los machos estériles tenían más probabilidades de tener una respuesta positiva a recopular si lo mostraban desde el principio; las frecuencias de reapareamiento más altas (entre 2 ó 3 ocasiones) se observaron más en los machos que se volvieron a aparear después de la primera cópula (51 %) en comparación con los machos que no recopularon en su primera oportunidad (13 %) ($\chi^2 = 4,034$, $P < 0,0446$).

En total, se identificó que el 92% de los machos estériles Vienna-8 recopularon al menos en una ocasión, independientemente de cuándo tuvo lugar dicho reapareamiento para los cuatro momentos temporales de recópula evaluados (24 horas, 48 horas, 4 días y 7 días después de la primera cópula) y que el comportamiento más frecuentemente observado fue aquel en el que los machos estériles recopularon en todas las ocasiones posibles ($f = 0,24$).

4.3.2. Análisis del esperma transferido en los reacoples

La transferencia de esperma se estimó de un total de 507 hembras procedentes de todos los momentos temporales de recópula. En este análisis se identificó la presencia de espermatozoides en el 99 % de las muestras procesadas, lo cual confirma que los machos estériles transfirieron de forma efectiva esperma en prácticamente todos sus reapareamientos realizados y para una duración de cópula de 100 minutos.

En cuanto a la abundancia de los espermatozoides transferidos por los machos estériles después de cada reapareamiento, se encontraron diferencias

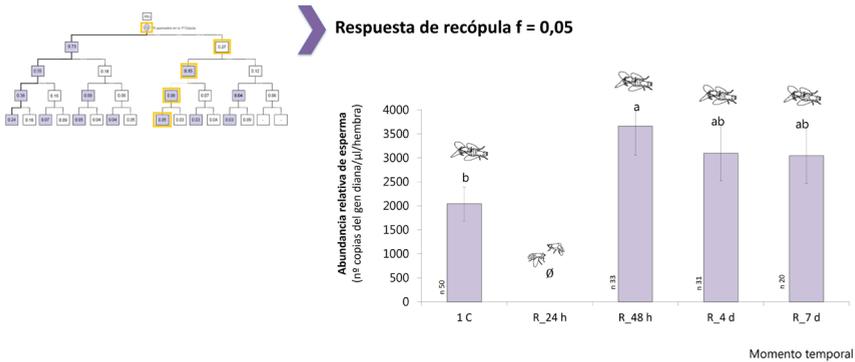
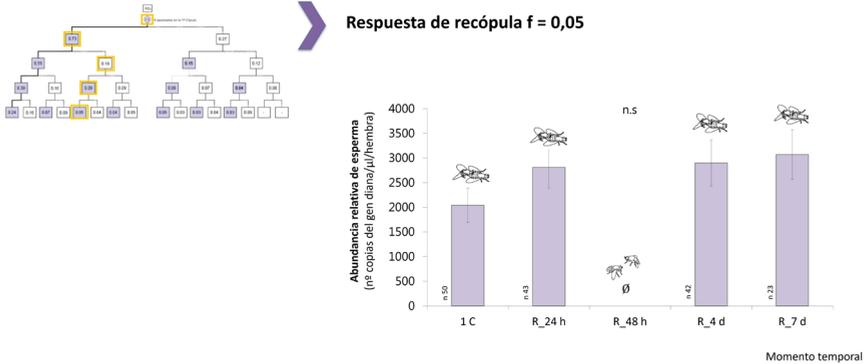
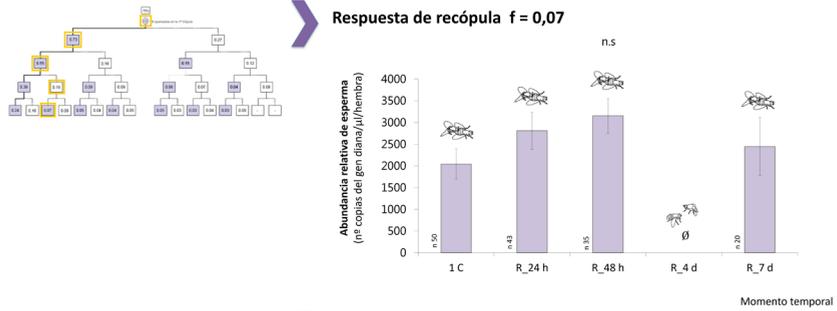
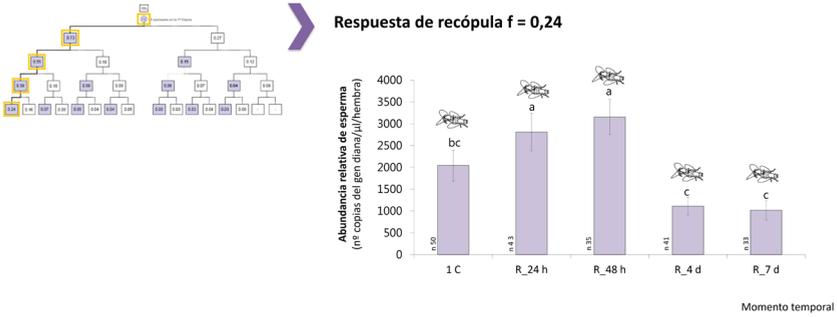


Figura C4.03 | Abundancia relativa de espermatozoides transferidos por los machos estériles Vienna-8 durante sus recóplulas. Cada subfigura representa el patrón temporal de los

según el comportamiento del macho a lo largo del ensayo y el momento temporal de recópula evaluado (24 horas, 48 horas, 4 días y 7 días después de la primera cópula) (Figura C4.03).

Para el comportamiento más frecuente de recópula ($f = 0,24$), en el patrón de transferencia se observa que la cantidad de esperma transferido a las hembras aumenta después de la primera cópula, siendo significativamente mayor en la segunda recópula de las 48 horas y tiende a disminuir a partir de esta ($F_{3, 168} = 6,01; P < 0,0001$).

En aquellos machos que mostraron reacoplos intermitentes, independientemente del momento temporal en que tuvieron lugar durante el ensayo, la cantidad de espermatozoides transferidos pareció aumentar también tras la primera cópula y disminuir en los últimos reapareamientos aunque no se encontraron diferencias significativas. No obstante, la transferencia de esperma parece haberse mantenido durante al menos tres apareamientos.

4.4. Discusión

Los machos estériles producidos en las biofábricas están sujetos a múltiples condiciones de estrés durante su proceso de cría masiva como las generadas en las operaciones de tinción y empaque de pupas, en el tratamiento de irradiación o el transporte; a pesar de estos condicionantes a los que están sometidos en el proceso de producción, en este estudio ha quedado de manifiesto que los machos estériles Vienna-8 han mostrado un comportamiento sexual positivo después de su primera cópula.

espermatozoides transferidos a las hembras y almacenados en sus espermatecas en las cuatro respuestas de comportamiento de recópula de los machos estériles más representativas (en la esquina superior izquierda se representa el ramal del diagrama de frecuencias que representa y su valor). El símbolo "Ø" indica que el macho no recópula durante ese momento temporal del ensayo secuencial y por tanto no hay transferencia de espermatozoides (estos valores no se incluyen en el análisis estadístico). Momentos temporales de apareamiento evaluados: primera cópula (1 C), pruebas de reapareamiento a las 24 horas (R_24 h), 48 horas (R_48 h), 4 días (R_4 d) y 7 días (R_7 d) después de la primera cópula. Los valores son el promedio del esperma encontrado en las espermatecas de al menos 20 hembras (el número de hembras evaluadas para cada caso se indica en cada subfigura). Las barras verticales representan el error estándar. Se realizaron ANOVAs independientes para cada patrón temporal y letras distintas indican diferencias estadísticas (análisis de varianza unidireccional $P < 0,05$; prueba de Tukey).

Más del 70 % de los machos estériles recopularon 24 horas después del primer apareamiento, una capacidad de recópula que refleja un período refractario sexual corto. De las cuatro ocasiones que tuvieron para reaparearse, el 57% de los machos se aparearon en al menos tres ocasiones y aproximadamente el 25% en todas ellas. McInnis y col. (2002) realizando un estudio en jaulas de campo (3 x 2,5 m) y cultivos de café sobre el comportamiento de apareamiento de *C. capitata* en Guatemala, encontraron que durante dos días consecutivos y en observaciones matutinas aproximadamente el 20 % de los machos silvestres y el 5 % de los machos de sus cepas de laboratorio irradiada del Centro de Producción Masiva de *C. capitata* “El Pino” (Petapa, Toliman, Vienna-42 y Antigua), recopularon en dos o más ocasiones. Estos valores son más bajos que los registrados en el presente trabajo, diferencia que podría deberse a su distinto contexto experimental y/o las cepas empleadas; en su estudio, las moscas se dejaron en las jaulas durante la noche después del primer día (al menos 18 h sin observación) y se analizó el apareamiento al mismo tiempo para cada sexo.

Con relación al esperma transferido durante las recópulas, el análisis mediante qPCR a tiempo real reveló que hubo transferencia efectiva durante los acoplamientos y prueba de ello es que en el 99% de las hembras vírgenes que copularon con los machos estériles (primera cópula y reacoplamientos) se detectaron espermatozoides almacenados en sus espermatecas. Este resultado es consistente con la información publicada en estudios previos con machos irradiados y no irradiados, donde en más del 95% de los apareamientos, entre individuos vírgenes y con duraciones de cópula de más de 90 minutos, hubo éxito en la transferencia de esperma (Seo y col., 1990; Taylor y Yuval, 1999).

En los tefrítidos se ha observado que los machos son capaces de producir esperma a lo largo de su vida adulta (Valdez, 2001). Cuando los machos son esterilizados mediante irradiación, ésta destruye los tejidos germinales en los testículos (espermatogonias), impidiendo la producción de nuevos espermatozoides y quedan, por tanto, con una cantidad finita de espermatozoides (Anwar y col., 1971).

El bajo número de espermatozoides (aspermia) como resultado de la irradiación se ha observado en especies como *Bactrocera tryoni* (Harmer y col., 2006) y *Zeugodacus cucurbitae* (Kuba y Itô, 1993), pero no es patente en otras especies de tefrítidos como en *Anastrepha ludens* (Abraham y col., 2016) o *A. fraterculus* (Allinghi y col., 2007; Abraham y col., 2013). Según los resultados obtenidos en este estudio, se desprende que los machos Vienna-8 estériles tienen suficiente esperma para inseminar a las hembras de tres a cinco apareamientos realizados durante 7 días. Una breve mención de Ohinata y col. (1978) apoya esta evidencia para *C. capitata*: mientras trabajaban en tratamientos de irradiación documentaron que los machos de irradiados con 18Krads de Cobalto-60 inseminaban aparentemente de cinco a ocho hembras vírgenes durante cuatro semanas. Por tanto, en el caso de los machos estériles de *C. capitata* pueden considerarse que están capacitados para recopular y transferir esperma en cada apareamiento.

La propensión de las hembras a volver aparearse con más de un macho ha sido un factor crítico ampliamente discutido en el contexto TIE en los tefrítidos; el hecho de que una hembra se aparee con un macho estéril y que potencialmente pueda buscar y volver a copular con un macho silvestre se considera que puede disminuir la eficacia de la técnica TIE (Pérez-Staples y col., 2013). El tiempo que tarda en volver a aparearse, es decir, el periodo refractario sexual, es otra de las variables que se han estudiado ampliamente de la conducta postcopulatoria de las hembras (Pérez-Staples y Abraham, 2023). En *C. capitata*, Mossinson y Yuval (2003) encontraron que 24 horas después de la primera cópula, las hembras volvieron a copular con una frecuencia del 8 y 15 % en el caso de aquellas que habían copulado con machos silvestres o machos estériles respectivamente. El porcentaje de hembras que vuelven a aparearse y la duración del periodo refractario dependen de numerosos factores y entre ellos se han citado la cantidad de esperma y otras sustancias seminales, como los productos de las glándulas accesorias, almacenadas por las hembras después del apareamiento (Jang, 1995; Miyatake y col., 1999;

Mossinson y Yuval, 2003; Bertin y col., 2010; Scolari y col., 2014a; Gabrieli y col., 2016; Msaad Guerfali y Chevrier, 2020;).

Aunque las hembras de *C. capitata* son facultativamente poliándricas durante su vida, y es elección de éstas aceptar o rechazar nuevos apareamientos, también una gran fracción de los machos estériles tienen la capacidad de reaparearse e inseminar como se observa en los resultados del presente estudio, respuesta que contribuye a compensar el fenómeno de la poliandria descrita en las hembras. Por otro lado, los machos estériles liberados tienen que competir inevitablemente en el campo con los machos silvestres, pero el hecho que los machos estériles tengan la capacidad de volver a aparearse con varias hembras y también de transferir esperma no fértil más de una vez es un comportamiento reproductivo que indudablemente infiere de forma positiva en las aplicaciones TIE.

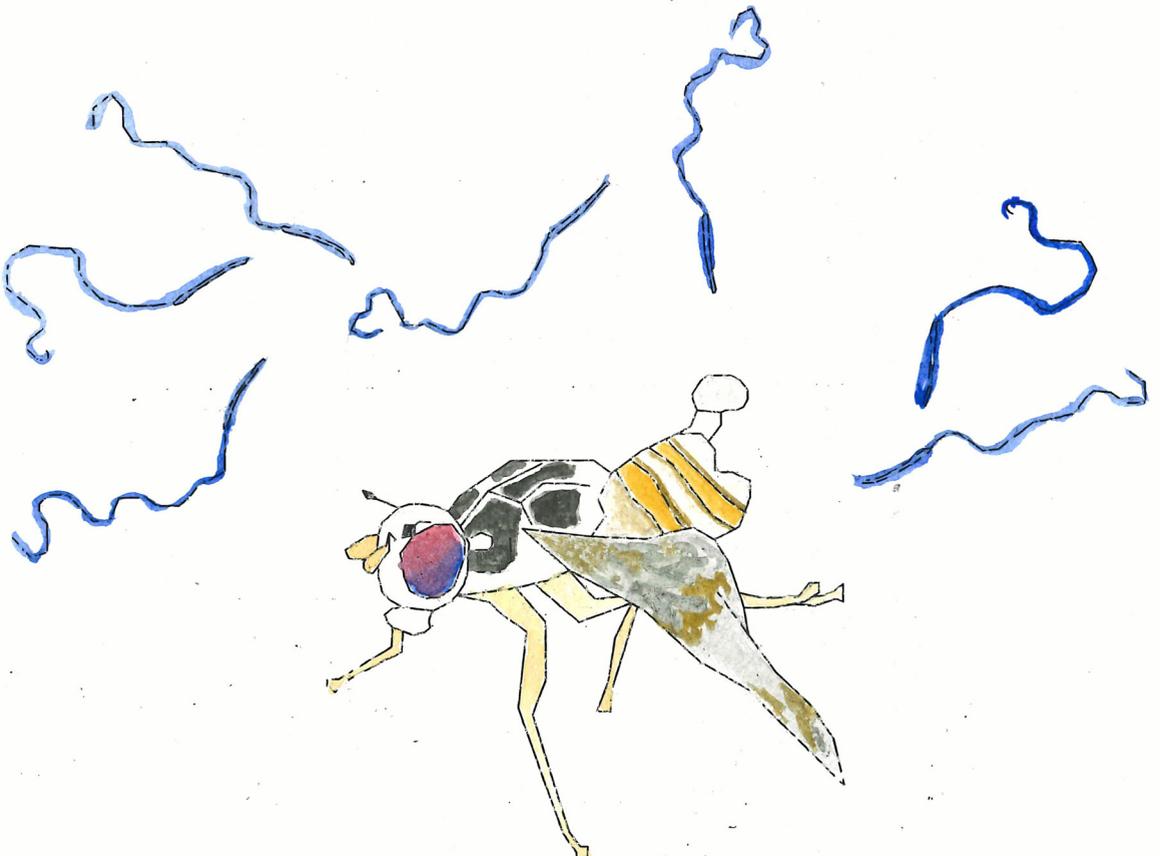
Conocer la frecuencia en que un macho estéril puede potencialmente aparearse y la cantidad de esperma que puede transferir revela información sobre su competitividad sexual que podría suponer implicaciones prácticas para las estrategias de gestión en los programas TIE ya que es un comportamiento que puede afectar a la eficiencia en el control de las poblaciones en las zonas de liberación de los machos estériles.

La evaluación de la ocurrencia de recópula e inseminación de los machos estériles podría ser incorporada como un parámetro reproductivo más a analizar en las pruebas de control de calidad e investigación que se llevan a cabo en las instalaciones de cría masiva de los programas TIE. Por otro lado, también sería importante comprobar si las frecuencias de reapareamiento encontradas en nuestros resultados en condiciones de laboratorio pueden reflejar las tasas reales que se podrían encontrar en la naturaleza, ya que pueden entrar en juego otros factores, como por ejemplo el efecto de la nutrición una vez liberados en campo por la disponibilidad o acceso a la proteína que pueden encontrarse

los machos estériles (Yuval y col., 2007). Así pues, en futuras investigaciones se podría abordar el análisis de esta tendencia al reapareamiento en condiciones seminaturales empleando jaulas de campo y también utilizando otros contextos experimentales aplicados como analizar dicha capacidad de recópula en presencia de sus rivales silvestres o hembras no vírgenes, dos escenarios que pueden representar mejor el sistema natural.

5

Discusión General



Capítulo 5

DISCUSIÓN GENERAL

Desarrollo de un método para la cuantificación de espermatozoides contenidos en las espermatecas mediante técnicas moleculares en *Ceratitis capitata*.

La espermatogénesis, así como la transferencia y el almacenamiento del esperma en las hembras tras la cópula, son procesos importantes en la biología reproductiva de aquellos insectos que presentan una estrategia reproductiva sexual, pues su supervivencia depende de la producción de los gametos y de su fusión para la formación de cigotos. La cuantificación de espermatozoides, junto a otros componentes del fluido espermático (como proteínas, lípidos o polisacáridos producidos por las glándulas accesorias de los machos AGFs -*accessory glands fluid*), resulta fundamental para progresar en el conocimiento de esta biología reproductiva y desarrollar nuevos estudios genéticos pueden contribuir a su determinación (Birkhead y col., 2009).

En el presente trabajo, se ha desarrollado para la especie *C. capitata* un nuevo método basado en PCR en tiempo real que permite una detección y cuantificación precisa del esperma transferido y almacenado en las espermatecas de las hembras después del apareamiento. Este método ha sido validado mediante comparación con conteos directos de espermatozoides y PCR convencional semicuantitativa. Representa una mejora significativa en el estudio de la transferencia de espermatozoides en este tefrítido, ofreciendo múltiples ventajas. Destaca especialmente la mejora en el rendimiento y la flexibilidad en el procesamiento de gran número de muestras, en comparación con las

técnicas tradicionales utilizadas como la cuantificación directa al microscopio, la fluorometría o la citometría de flujo). Además, su especificidad, al basarse en marcadores del cromosoma Y, evita los problemas relacionados con el ADN de las células maternas, los cuales se han encontrado usando otras metodologías, como las llevadas a cabo en *Anastrepha suspensa* donde se emplearon marcadores microsatelitales (Fritz y col., 2010; Dhakal y col., 2018). Además, esta metodología de análisis específico del cromosoma Y, representa una base para el desarrollo de otros métodos de cuantificación de espermatozoides presentes en órganos funcionales de almacenamiento de esperma en otras especies de tefrítidos, como *Bactrocera tryoni* (Shadmany y col., 2021).

Una conclusión relevante de este estudio es la confirmación de la alta sensibilidad y especificidad del nuevo método desarrollado, que ha demostrado ser capaz de detectar la presencia de espermatozoides en las espermatecas de las hembras después de cópulas de tan solo 10 minutos. Este hallazgo que no se había logrado con técnicas moleculares anteriores de detección de esperma mediante PCR (San Andrés y col., 2007; Juan-Blasco y col., 2013a, 2013c, 2014). Esta mayor capacidad de detección abre nuevas vías para entender mejor las dinámicas de apareamiento y transferencia de esperma en situaciones reales, especialmente en programas de control de plagas donde la eficiencia en la transferencia de esperma estéril es crítica (Pérez-Staples y col., 2013).

Análisis de la transferencia efectiva de espermatozoides y revisión de los patrones de transferencia según la duración de la cópula en *C. capitata*.

En los insectos no todos los apareamientos concluyen con una transferencia efectiva de esperma. En el caso de los tefrítidos se han observado porcentajes de cópula sin inseminación variables que pueden llegar a representar una tercera parte de los apareamientos (Harmer y col., 2006; Perez-Staples y col., 2007; Radhakrishnan y col., 2009; Pérez-Staples y col., 2010; Shadmany y col., 2021). Los valores obtenidos en este estudio en *C. capitata* están en línea en los descritos en otros estudios previos (Wong y col., 1984; Camacho, 1989; Seo

y col., 1990; Whittier y Kaneshiro, 1995). El porcentaje medio de cópulas con inseminación se sitúa por lo general por encima del 80% con independencia de la cepa del macho y reduciéndose dicho valor cuando se trata de apareamientos de corta duración, lo cual puede atribuirse a la velocidad de transferencia de los espermatozoides a la hembra y la llegada de los espermatozoides a sus órganos de almacenamiento, situación observada en otros tefritidos como *Anastrepha spatulata* (Pérez-Staples y col., 2014).

Con relación a la edad de los machos y la transferencia de espermatozoides, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que no hay un efecto de la edad en la inseminación. Así pues, no se identifica, para las tres edades evaluadas, ni un declive ni un incremento significativo en la cantidad de espermatozoides transferidos por machos silvestres o Vienna-8 estériles. Una falta de relación descrita también en *C. capitata* por Papanastasiou y col., (2011) y Shelly y col., (2011), pero que contrasta con la de otros estudios que sí afirman un efecto de la edad del macho en la transferencia de esperma (Costa y col., 2012; Taylor y col., 2001). Estas diferencias podrían explicarse por el rango de edades evaluadas y el estado de madurez sexual de los individuos.

La ausencia de un efecto de la edad del macho para las edades comprendidas en este estudio aporta un conocimiento relevante en el contexto de los programas TIE. Los resultados apoyan que se podría liberar machos Vienna-8 estériles de un rango de edad más amplio que el actual, sin que se vea penalizada la eficacia de la técnica con respecto al potencial de transferencia de esperma. Ello significa una gran ventaja logística al aumentar la flexibilidad en los procesos de producción y liberación masiva de machos estériles, procesos fuertemente dependientes de los factores climatológicos externos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que haría falta más investigación para valorar la capacidad de transferencia de esperma a distintos rangos de edad en conjunto a otros parámetros de producción como la supervivencia o la competitividad sexual bajo condiciones de cría masiva.

Otro de los factores evaluados en este estudio ha sido la duración de la cópula, vinculada al proceso de transferencia de esperma, y cuya influencia ha sido demostrada en varios insectos (Yamagishi y Tsubaki, 1990; Eberhard, 1996; Engqvist y col., 2007; Himuro y Fujisaki, 2015; Perez-Hedo y col., 2014;). La relación entre duración de cópula y cantidad de esperma transferido ha generado controversia, y en el caso de *C. capitata* ha habido discrepancias respecto a la existencia o no de una relación entre ambos factores (Farias y col., 1972; Seo y col., 1990; Taylor and Yuval, 1999; Taylor y col., 2000, 2001; Costa y col., 2012). Los resultados de este trabajo, donde se analiza una amplia horquilla de tiempo, ponen de manifiesto una relación positiva de tiempo de cópula y transferencia de esperma, tanto en los apareamientos con machos silvestres como en Vienna-8 estériles. Esta asociación directa incrementa gradualmente hasta estabilizarse y llegar un punto que un incremento adicional de tiempo en la cópula (cópulas más prolongadas) no se traduce en un aumento significativo de espermatozoides transferidos; un patrón de transferencia análogo al obtenido en *Bactrocera tryoni* (Shadmany y col., 2021)

La evolución de los espermatozoides transferidos y almacenados según el tiempo de cópula ha resultado similar tanto en los apareamientos con machos silvestres como con machos Vienna-8 estériles. Sin embargo, se constata una diferencia en términos de cantidad ya que el número de espermatozoides transferidos en las cópulas más prolongadas es significativamente mayor en los machos silvestres. Esta evidencia está en línea con algunos estudios en *C. capitata* que muestran que el esperma almacenado en hembras acopladas con machos irradiados tiende a ser inferior que aquellas acopladas con machos de la misma cepa no irradiados o silvestres (Seo y col., 1990; Taylor y col., 2001; Mossinson y Yuval, 2003).

Estos resultados reabren el debate del efecto de la irradiación sobre el rendimiento sexual y la inseminación de los machos producidos e irradiados para los programas TIE (Hendrichs y col., 2002; Lux y col., 2002; Dominiak y col., 2010;

Weldon y col., 2010; Collins y col., 2012; Msaad Guerfali y Chevrier, 2020). Además, refuerzan la necesidad de profundizar en estudios sobre dosis de irradiación y esperma transferido (Zumreoglu y col., 1979; M'saad Guerfali y col., 2011) así como el posible agotamiento de espermatozoides a lo largo de su vida adulta (Katiyar y Ramirez, 1970; Hooper, 1971; Kuba y Itô, 1993; Radhakrishnan y col., 2009).

Respuesta de recópula en machos estériles Vienna-8

El fenómeno del apareamiento múltiple ha sido investigado en las poblaciones naturales de *C. capitata* (Bonizzoni y col., 2006; Kraaijeveld y col., 2005; McInnis, 1993). En el caso de las hembras ha sido ampliamente estudiada considerándose éstas poliándricas facultativas (p. ej. McInnis, 1993; Whittier y Shelly, 1993; Bonizzoni y col., 2002, 2006; Mossinson y Yuval, 2003; Gavriel y col., 2009; Bertin y col., 2010; Scolari y col., 2014b). Al igual que las hembras, se ha observado que los trefritados machos pueden reaparearse repetidamente (Kuba y Itô 1993; Aluja y col., 2001; Pérez-Staples y Aluja 2004; Perez-Staples y Aluja 2006b; Aluja y col., 2008). En *C. capitata*, tanto la tendencia al reapareamiento de los machos como la capacidad de transferencia de esperma han sido poco documentadas (Nakagawa y col., 1971; McInnis y col., 2002), y este trabajo constituye el primer estudio que aborda en detalle la capacidad de recópula de los machos estériles Vienna-8.

Este estudio ha revelado aspectos cruciales sobre la dinámica de reapareamiento y transferencia de esperma en los machos estériles Vienna-8, con implicaciones positivas para los programas de control de plagas mediante la Técnica del Insecto Estéril (TIE). Se ha demostrado que los machos estériles Vienna-8 tienen la capacidad de copular repetidamente y de transferir esperma de manera efectiva en dichas cópulas sucesivas. Estos hallazgos evidencian un comportamiento sexual positivo y una capacidad de inseminación considerable. Esto ocurre a pesar de las condiciones adversas derivadas del proceso de cría masiva y las limitaciones inherentes al proceso de esterilización, las cuales

podrían afectar la calidad de los individuos producidos (Liimatainen y col., 1997; Cayol, 1999; Dominiak y col., 2010; Dyck y col., 2021).

Esta tesis sugiere que el tratamiento de irradiación, aunque destruye los tejidos germinales necesarios para la producción de nuevos espermatozoides (Muller, 1927, 1954; Proverbs, 1968; Teruya y col., 1985), no impide que los machos estériles tengan suficiente esperma para varias inseminaciones. Esto rebate la preocupación de que la irradiación podría limitar severamente la capacidad de los machos estériles para participar efectivamente en el control de la población mediante la TIE (Itô y Yamagishi, 1989; Kuba y Itô, 1993; Radhakrishnan y col., 2009). Además, el estudio ha arrojado luz sobre el impacto en la TIE de la poliandria de las hembras en *C. capitata* (Pérez-Staples y col., 2013), al revelar la capacidad de los machos estériles para satisfacer la tendencia natural de las hembras a recopilar, aspecto que repercute positivamente en la eficiencia de la TIE como estrategia de control de plagas.

Perspectivas futuras

Las implicaciones prácticas de esta tesis se extienden más allá del ámbito científico de generación de conocimiento, ya que ofrece perspectivas valiosas para la implementación y optimización de programas de manejo integrado de plagas y control de vectores de enfermedades en el ámbito agrícola.

Así pues, el nuevo método molecular desarrollado para cuantificar la transferencia y almacenamiento de espermatozoides constituye una herramienta útil no solo para la investigación básica en el conocimiento sobre la biología reproductiva de esta especie plaga, sino también para evaluar la calidad y la competencia en la inseminación de los machos estériles producidos en masa en los programas TIE o investigar factores como la dieta o la dosis de irradiación, todo ello dirigido a la optimización de estrategias para la mejora del rendimiento reproductivo y la competitividad de los machos estériles liberados.

Los resultados de este estudio, particularmente en relación con la transferencia de esperma de los machos estériles de *C. capitata* y su capacidad de recópula, proporcionan una base sólida para el diseño de estrategias de liberación más efectivas y eficientes. La confirmación de que los machos estériles pueden realizar múltiples inseminaciones sugiere que la densidad y frecuencia de liberación de machos estériles pueden ser ajustadas de manera más precisa para maximizar la supresión de la población de plagas y la rentabilidad de los programas TIE al reducir los costos asociados con la producción y liberación de insectos estériles, la cual contribuye sin lugar a dudas a la sostenibilidad ambiental al disminuir la dependencia de insecticidas químicos.

Sin embargo, para trasladar estos hallazgos del laboratorio a la práctica, sería fundamental realizar más estudios aplicados en condiciones de campo. Estos estudios deberían enfocarse en evaluar la eficacia de los machos estériles en diferentes contextos ambientales y sistemas agrícolas, para ajustar las estrategias de liberación a las condiciones locales y maximizar el impacto en las poblaciones de plagas. Asimismo, investigar para la optimización de un método de extracción de ADN de alta calidad supondría un avance para el análisis de alto rendimiento de muestras en los programas TIE.

En última instancia, estos resultados subrayan la importancia de las investigaciones fundamentales sobre la biología y el comportamiento reproductivo de las especies objetivo en el éxito a largo plazo de los programas de control de plagas basados en la TIE, reafirmando el valor de enfoques científicamente informados y ecológicamente racionales en el manejo de plagas.

6

Conclusiones



Capítulo 6

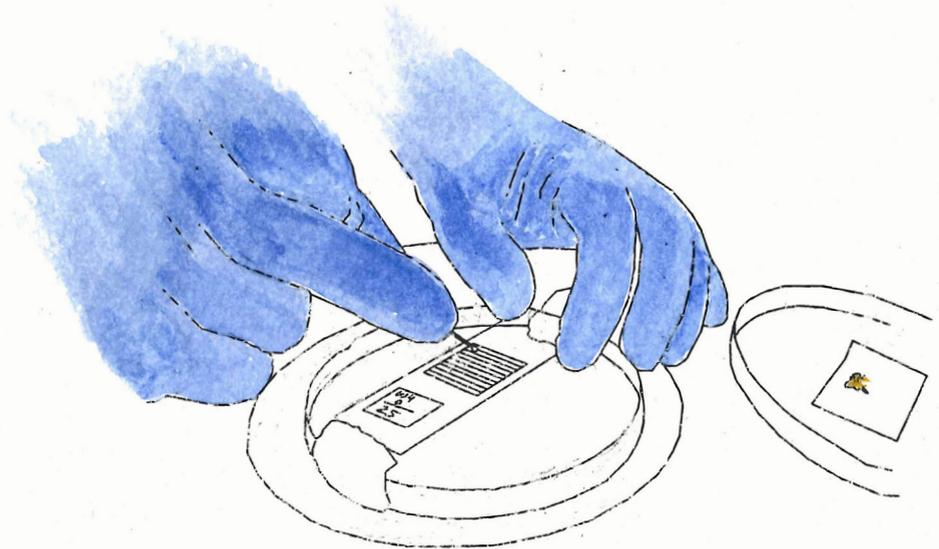
CONCLUSIONES

A partir de la consecución de los objetivos de la presente tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El nuevo método de cuantificación de esperma basado en PCR en tiempo real mediante marcadores del cromosoma Y ofrece una alternativa precisa y más flexible que los métodos tradicionales para la cuantificación en órganos de almacenamiento, lo que significa una ventaja a la hora de estudiar la biología reproductiva de *Ceratitis capitata*.
2. La constatación de la ausencia de un efecto de la edad del macho para las edades comprendidas en este estudio en la transferencia de esperma aporta un conocimiento relevante en el contexto de los programas TIE, pues repercute en poder liberar machos Vienna-8 estériles de un rango de edad más amplio sin que se vea penalizada su eficacia en este aspecto. Ello significa una gran ventaja logística al aumentar la flexibilidad en los procesos de producción y liberación masiva de machos estériles, procesos fuertemente dependientes de los factores climatológicos externos.
3. Existe una relación positiva de tiempo de cópula y transferencia de esperma, tanto en los apareamientos con machos silvestres como en Vienna-8 estériles; una asociación directa que incrementa gradualmente hasta estabilizarse y llegar un punto que un incremento adicional de tiempo en la cópula (cópulas más prolongadas) no se traduce en un aumento significativo de espermatozoides transferidos.

4. Se constata una diferencia en términos de cantidad de espermatozoides transferidos entre los machos silvestres y Vienna-8 estériles a partir de una determinada duración de cópula y se destaca la necesidad de más investigaciones para mejorar la comprensión de la transferencia de esperma en machos irradiados.
5. Los machos estériles Vienna-8 han demostrado una notable capacidad para recopular así como transferir esperma efectivamente a hembras silvestres, lo cual revela que poseen suficiente reserva de espermatozoides para varias cópulas, asegurando que un mayor número de hembras sean inseminadas con esperma estéril y reduciendo así la fecundidad de la población silvestre.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, S., Goane, L., Cladera, J., Vera, M.T., 2011a. Effects of male nutrition on sperm storage and remating behavior in wild and laboratory *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females. *J. Insect. Physiol.* 57, 1501–1509. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.08.004>
- Abraham, S., Goane, L., Rull, J., Cladera, J., Willink, E., Vera, M.T., 2011b. Multiple mating in *Anastrepha fraterculus* females and its relationship with fecundity and fertility. *Entomol. Exp. Appl.* 141, 15–24. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01160.x>
- Abraham, S., Lara-Pérez, L.A., Rodríguez, C., Contreras-Navarro, Y., Nuñez-Beverido, N., Ovruski, S., Pérez-Staples, D., 2016. The male ejaculate as inhibitor of female remating in two tephritid flies. *J. Insect. Physiol.* 88, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.03.001>
- Abraham, S., Liendo, M.C., Devescovi, F., Peralta, P.A., Yusef, V., Ruiz, J., Cladera, J.L., Vera, M.T., Segura, D.F., 2013. Remating behavior in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females is affected by male juvenile hormone analog treatment but not by male sterilization. *Bull. Entomol. Res.* 103, 310–317. <https://doi.org/10.1017/S0007485312000727>
- Abraham, S., Moyano, A., Díaz, V., Murúa, M.G., Rull, J., 2023. Female control of sperm ejection and retention in the cornsilk fly *Euxesta eluta* (Diptera: Ulidiidae). *Insect. Sci.* 30, 1183–1190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1744-7917.13144>
- Aguilar, J.G., López, L., Pérez, E., López, E., Marroquin, V., Domínguez, J., 2003. Manual to differentiate wild, fertile Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) from irradiated, sterile, temperature sensitive lethal

- flies. FAO/IAEA (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ International Atomic Energy Agency), Vienna, Austria.
- Ali-Ahmed D., Soltani N., Kellouche A., Mazouzi F., 2007. Effects of the soil texture and the burying depth of the larvae on some biological parameters of *Ceratitis capitata* (Diptera: Trypetidae). *Afr. J. Agric. Res.* 2, 105–111.
- Allinghi, A., Gramajo, C., Willink, E., Vilardi, J., 2007. Induction of sterility in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by gamma radiation. *Fla. Entomol.* 90, 96–102. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2007\)90\[96:IOSIAF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2007)90[96:IOSIAF]2.0.CO;2)
- Almeida, J.E.M., Batista, A., Oliveira, F.C., Raga, A., 2007. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi and nematode on medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *BioAssay*, 2. <https://doi.org/https://doi.org/10.14295/BA.v2.0.12>
- Aluja, M., Acome, I.J., Macías-Ordóñez, R., Ordó, O., Ordóñez, O., 2001. Effect of adult nutrition on male sexual performance in four Neotropical fruit fly species of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *J. Insect Behav.* 14, 754–775. <https://doi.org/10.1023/A:1013037400676>
- Aluja, M., Liedo, P., 1993. *Fruit Flies: Biology and Management*. Springer New York, New York. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Aluja, M., Mangan, R.L., 2008. Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Host status determination: Critical, conceptual, methodological and regulatory considerations. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 473–502. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093350>
- Aluja, M., Pérez-Staples, D., Sivinski, J., Sánchez, A., Piñero, J., 2008. Effects of male condition on fitness in two Tropical tephritid flies with contrasting life histories. *Anim. Behav.* 76, 1997–2009. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.08.020>
- Anwar, M., Chambers, D.L., Ohinata, K., Kobayashi, R.M., 1971. Radiation-sterilization of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Comparison of spermatogenesis in flies treated as pupae or adults. *Ann. Entomol. Soc. Am* 64, 627–633. <https://doi.org/10.1093/aesa/64.3.627>

- Arenas, F.J., Hervalejo García, A., De Luna Armenteros, E., 2015. Guía de cubiertas vegetales en cítricos. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, pp.1–16.
- Argilés, R., Pla, I., Castañera, P., Moltó, E., Urbaneja, A., Juste, F., 2007. Aplicación de la técnica del insecto estéril contra la mosca mediterránea de la fruta en la Comunidad Valenciana. *Agrónomos: Órgano Profesional de los Ingenieros Agrónomos* 34, 35–44.
- Arita, L.H., 1982. Reproductive and sexual maturity of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 21, 25–29.
- Arita, L.H., Kaneshiro, K.Y., 1989. Sexual selection and lek behavior in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Pac. Sci.* 43, 135–143.
- Arouri, R., Le Goff, G., Hemden, H., Navarro-Llopis, V., M'saad, M., Castañera, P., Feyereisen, R., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. 2015. Resistance to lambda-cyhalothrin in Spanish field populations of *Ceratitidis capitata* and metabolic resistance mediated by P450 in a resistant strain. *Pest. Manag. Sci.* 71(9), 1281–1291. <https://doi.org/10.1002/ps.3924>
- Arozarena Doblado, R., 1966. Los parásitos de la *Ceratitidis capitata* Wied., En Fernández, J.M., Arozarena Doblado, R. (Eds.), *La Mosca de la fruta en Tenerife*. Instituto de Estudios Canarios, La Laguna de Tenerife, pp. 29–37.
- Arthur, V., Machi, A., Mastrangelo, T., 2015. Ionizing radiations in entomology. En Nenoj, M. (Ed.), *Evolution of Ionizing Radiation Research*. InTech, Croatia, pp. 213–234. <https://doi.org/10.5772/60409>
- Augustinos, A.A., Targovska, A., Cancio-Martinez, E., Schorn, E., Franz, G., Cáceres, C., Zacharopoulou, A., Bourtzis, K., 2017. *Ceratitidis capitata* genetic sexing strains: laboratory evaluation of strains from mass-rearing facilities worldwide. *Entomol. Exp. Appl.* 164, 305–317. <https://doi.org/10.1111/eea.12612>
- Back, E.A., Pemberton, C.E., 1915. Susceptibility of citrus fruits to the attack of the Mediterranean fruit fly. *J. Agric. Res.* 3, 311–330.

- Baker, P.S., van der Valk, H., 1992. Distribution and behaviour of sterile Mediterranean fruit flies in a host tree. *J. Appl. Entomol.* 114, 67–76. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1992.tb01097.x>
- Bakri, A., Heather, N., Hendrichs, J., Ferris, I., 2005. Fifty years of radiation biology in entomology: Lessons Learned from IDIDAS. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 1–12. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0001:FYORBI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0001:FYORBI]2.0.CO;2)
- Bakri, A., Mehta, K., Lance, D.R., 2021. Sterilizing insects with ionizing radiation. En Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. CRC Press. pp. 355–398.
- Bali, E.M.D., Moraiti, C.A., Ioannou, C.S., Mavraganis, V., Papadopoulos, N.T., 2021. Evaluation of mass trapping devices for early seasonal management of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) populations. *Agronomy* 13 (10): 941. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061101>
- Báo, S.N., Dolder, H., 1990. Ultrastructural localization of acid phosphatase in spermatid cells of *Ceratitis capitata* (Diptera). *Histochemistry* 93, 439–442. <https://doi.org/10.1007/BF00315864>
- Báo, S.N., Quagio-Grassiotto, I., Dolder, H., 1989. Acrosome formation in *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Cytobios* 58, 93–100.
- Barratt, B. I., Colmenarez, Y. C., Day, M. D., Ivey, P., Klapwijk, J. N., Loomans, A. J., Mason P.G., Palmer, W.A., Sankaran, K.V., Zhang, F. (2021). Regulatory challenges for biological control. En Mason, P.G. (Ed.) *Biological control: global impacts, challenges and future directions of pest management*, pp. 166–196.
- Bateman, M.A., 1972. The ecology of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.* 17, 493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.17.010172.002425>
- Beers, E. H., Mills, N. J., Shearer, P. W., Horton, D. R., Milickzy, E. R., Amarasekare, K. G., Gontijo, L. M., 2016. Nontarget effects of orchard pesticides on natural enemies: lessons from the field and laboratory. *Biological Control*, 102, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.010>
- Beitia Crespo, F., Pérez-Hinarejos, M., Santiago, S., Garzón, E., Tarazona, I., 2007. Control biológico con parasitoides. *Levante Agrícola*, 385 (Monografía *Ceratitis capitata*), 145–150.

- Bellekom, B., Hackett, T.D., Lewis, O.T., 2021. A network perspective on the vectoring of human disease. *Trends Parasitol.* 37, 391–400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.12.001>
- Bertin, S., Scolari, F., Guglielmino, C.R., Bonizzoni, M., Bonomi, A., Marchini, D., Gomulski, L.M., Gasperi, G., Malacrida, A.R., Matessi, C., 2010. Sperm storage and use in polyandrous females of the globally invasive fruitfly, *Ceratitidis capitata*. *J. Insect. Physiol.* 56, 1542–1551. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.05.006>
- Biobest, 2024. Biobest Side Effects. Acceso: 03.03.204 <http://www.biobestgroup.com/es/manual-de-efectos-secundarios>
- Birkhead, T.R., Hosken, D.J., Pitnick, S., 2009. Sperm biology: An evolutionary perspective. Academic Press, London, UK.
- Bjeliš, M., Popović, L., Kiridžija, M., Ortiz, G., Pereira, R., 2016. Suppression of Mediterranean fruit fly using the sterile insect technique in Neretva River Valley of Croatia. En Sabater-Muñoz, B., Vera, T., Pereira, R., Orankanok, W. (Eds.), *Proceedings: 9th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance* 12–16 May 2014, Bangkok, Thailand. pp. 29–45.
- Blay, S., Yuval, B., 1999. Oviposition and fertility in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Effects of male and female body size and the availability of sperm. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, 278–284. <https://doi.org/10.1093/aesa/92.2.278>
- Blay, S., Yuval, B., 1997. Nutritional correlates of reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Anim. Behav.* 54, 59–66. <https://doi.org/10.1006/anbe.1996.0445>
- Bodenheimer, F.S., 1951. Citrus entomology: In the Middle East with special references to Egypt, Iran, Irak, Palestine, Syria, Turkey. Springer Netherlands.
- Bonizzoni, M., Gomulski, L.M., Mossinson, S., Guglielmino, C.R., Malacrida, A.R., Yuval, B., Gasperi, G., 2006. Is polyandry a common event among wild populations of the pest *Ceratitidis capitata*? *J. Econ. Entomol.* 99, 1420–1429. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.4.1420>

- Bonizzoni, M., Katsoyannos, B.I., Marguerie, R., Guglielmino, C.R., Gasperi, G., Malacrida, A., Chapman, T., 2002. Microsatellite analysis reveals remating by wild Mediterranean fruit fly females, *Ceratitidis capitata*. *Mol. Ecol.* 11, 1915–1921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01602.x>
- Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M.A., Jaques Miret, J.A., Justesen, A.F., Magnusson, C.S., Milonas, P., Navas-Cortes, J.A., Parnell, S., Potting, R., Reignault, P.L., Thulke, H.H., Van der Werf, W., Vicent Civera, A., Yuen, J., Zappalà, L., Bali, E.M., Papadopoulos, N., Papanastassiou, S., Czwieniczek, E., MacLeod, A., 2020. Pest categorisation of non-EU Tephritidae. *EFSA Journal* 18, 1–62. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5931>
- Briceño, R.D., Eberhard, W.G., 1998. Medfly courtship duration: A sexually selected reaction norm changed by crowding. *Ethol. Ecol. Evol.* 10, 369–382. <https://doi.org/10.1080/08927014.1998.9522850>
- Bueno, A. D. F., Carvalho, G. A., Santos, A. C. D., Sosa-Gómez, D. R., Silva, D. M. D., 2017. Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. *Ciência Rural*, 47(6) <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160829>
- Buxton, P.A., 1955. The natural history of Tsetse flies: An account of the biology of the genus *Glossina* (Diptera). *Mem. Lond. Sch. Hyg. Trop. Med.* No. 10, H. K. Lewis, London.
- CABI (Centre for Agriculture and Bioscience International), 2020. *Ceratitidis capitata* (Mediterranean fruit fly). En CAB International (Ed.), *Invasive species compendium*. Wallingford, UK. URL <https://www.cabi.org/ISC/datasheet/12367> (Acceso: 14.02.2024). <https://doi.org/10.1079/cabicompndium.12367>
- Camacho, H., 1989. Transferencia de espermatozoides en la mosca del Mediterráneo *Ceratitidis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae). Master's thesis, Universidad de Costa Rica.
- Campos-Herrera, R., Gutiérrez, C., 2009. Screening Spanish isolates of steinernematid nematodes for use as biological control agents through laboratory and greenhouse microcosm studies. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.009>

- Cancino, J., López, P., Orozco-Dávila, D., 2021. Host-searching capacity of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) as a measure for evaluating quality in mass rearing. *Biocontrol Sci. Technol.* 31, 1349–1364. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1950124>
- Cano-Barbacid, C. , Carrete, M. , Castro-Díez, P., Delibes-Mateos, M., Jaques, J.A., López-Darias, M., Nogales, M., Pino, J., Ros, M., Traveset, A., Turon, X., Vilà, M., Altamirano, M., Álvarez, I., Arias, A., Boix, D., Cabido, C., Cacabelos, E., Cobo, F., Cruz, J., Cuesta, J.A., Dáder, B., del Estal, P., Gallardo, B., Gómez-Laporta, M., González-Moreno, P., Hernández, J. C., Jiménez-Alfaro, B., Lázaro Lobo, A., Leza, M., Montserrat, M., Oliva-Paterna, F.J., Piñeiro, L., Ponce, C., Pons, P., Rotchés-Ribalta, R., Roura-Pascual, N., Sánchez, S., Trillo, A., Viñuela, E., García-Berthou, E., 2023. Identification of potential invasive alien species in Spain through horizon scanning. *Journal of Environmental Management*, Volume 345, 118696. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118696>
- Carey, J.R., 1991. Establishment of the Mediterranean fruit fly in California. *Science* 253, 1369–1373. <https://doi.org/10.1126/science.1896848>
- Carroll, L.E., I.M. White, A. Freidberg, A.L. Norrbom, M.J. Dallwitz, Thompson, F.C. 2024. Pest fruit flies of the world – larvae. Version: 9th April 2019. Acceso: 31.08.2024. <https://www.delta-intkey.com/ffl/index.htm>
- Castañera, P., 2003. Control integrado de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. *Phytoma España* 153, 131–133.
- Castells-Sierra, J., Guillem-Amat, A., López-Errasquín, E., Sánchez, L., Ortego, F., 2023. First detection of resistance to deltamethrin in Spanish populations of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *J. Pest. Sci.* 96, 1229–1242. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01578-1>
- Causse, R., 1972. Ontogenese des cellules reproductrices chez *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera, Trypetidae). En Institut National de la Recherche Agronomique (Ed.), *Annales de zoologie, écologie animale*. Vol. 4. pp. 35–53.
- Cayol, J.-P., 1999. Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by mass-rearing processes. En Aluja, M., Norrbom, A. (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*, CRC Press. pp. 861–878.

- Cayol, J.P., Causse, R., Louis, C., Barthes, J., 1994. Medfly *Ceratitis capitata* Wiedemann (Dipt., Trypetidae) as a rot vector in laboratory conditions. *J. Appl. Entomol.* 117, 338–343. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1994.tb00744.x>
- Choe, J.C., 1995. Courtship feeding and repeated mating in *Zorotypus barberi* (Insecta: Zoraptera). *Anim. Behav.* 49, 1511–1520. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(95\)90072-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(95)90072-1)
- Christenson, L.D., Foote, R.H., 1960. Biology of Fruit Fly. *Annu. Rev. Entomol.* 5, pp. 171–192.
- Churchill-Stanland, C., Stanland, R., Wong, T.T.Y., Tanaka, N., Mcinnis, D.O., Dowell, R.V., 1986. Size as a factor in the mating propensity of Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 79, 614–619. <https://doi.org/10.1093/jee/79.3.614>
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G.J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., Karol, H., 2017. Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie* 48, 211–222. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0466-2>
- Clausen, C.P., Clancy, D.W., Chock, Q.C., 1965. Biological control of the oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. Agricultural Research Service. US Department of Agriculture.
- Cock, M.J.W., van Lenteren, J.C., Brodeur, J., Barratt, B.I.P., Bigler, F., Bolckmans, K., Côté, F.L., Haas, F., Mason, P.G., Parra, J.R.P., 2010. Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? *BioControl* 55, 199–218. <https://doi.org/10.1007/s10526-009-9234-9>
- Collins, A.M., 2005. Insemination of honey bee, *Apis mellifera*, queens with non-frozen stored semen: Sperm concentration measured with a spectrophotometer. *J. Apic. Res.* 44, 141–145. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101168>
- Collins, S.R., Pérez-Staples, D., Taylor, P.W., 2012. A role for copula duration in fertility of Queensland fruit fly females mated by irradiated and unirradiated males. *J Insect Physiol* 58, 1406–1412. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.08.004>

- Costa, A.M., Anjos-Duarte, C.S., Roriz, A.K.P., Dias, V.S., Joachim-Bravo, I.S., 2012. Male diet and age influence to inhibit female remating in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.* 136, 456–463. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01669.x>
- Costantino, G., 1930. Contributo alla conoscenza della mosca delle frutta (*Ceratitis capitata* Wied.) (Diptera: Trypaneidae). *Boll. Lab. Zool. Gen. agr. Portici* 23, 237–322.
- Cournault, L., Aron, S., 2008. Rapid determination of sperm number in ant queens by flow cytometry. *Insectes Soc.* 55, 283–287. <https://doi.org/10.1007/s00040-008-1003-8>
- Cristian Vidal-Quist, J., Castañera, P., González-Cabrera, J., 2010. Cyt1Aa protein from *Bacillus thuringiensis* (Berliner) serovar israelensis is active against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). *Pest. Manag. Sci.* 66, 949–955. <https://doi.org/10.1002/ps.1965>
- Cruz-Miralles, J., Garrido-Jurado, I., Yousef-Yousef, M., Ibáñez-Gual, M. V., Dembilio, Ó., Quesada-Moraga, E., Jaques, J.A. 2024. Compatibility of soil application of *Metarhizium brunneum* and cover crops against *Ceratitis capitata* soil-dwelling stages. *J. Pest. Sci.* <https://doi.org/10.1007/s10340-023-01705-6>
- Dallai, R., Marchini, D., Del Bene, G., 1993. The ultrastructure of the spermatheca in *Ceratitis capitata* Wied. and *Dacus oleae* Gmel. (Diptera:Tephritidae). *Redia* 76, 147–167.
- de Aquino, J.C., Joachim-Bravo, I.S., 2013. Relevance of male size to female mate choice in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Investigations with wild and laboratory-reared flies. *J. Insect. Behav.* 27, 162–176. <https://doi.org/10.1007/s10905-013-9410-8>
- de Carlo, J.M., Pellerano, G.N., Martinez, L.I., 1994. Saco del oviducto medio de *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae): consideraciones histofuncionales. *Physis* 49, 19–25.
- De Jesus, C.E., Reiskind, M.H., 2016. The importance of male body size on sperm uptake and usage, and female fecundity in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1734-8>

- de Jong, Y., Verbeek, M., Michelsen, V., Bjørn, P. de P., Los, W., Steeman, F., Bailly, N., Basire, C., Chylarecki, P., Stloukal, E., Hagedorn, G., Wetzler, F.T., Glöckler, F., Kroupa, A., Korb, G., Hoffmann, A., Häuser, C., Kohlbecker, A., Müller, A., Güntsch, A., Stoev, P., Penev, L., 2014. Fauna Europaea – all European animal species on the web. Biodivers Data J 2, e4034. <https://doi.org/10.3897/BDJ.2.e4034>
- De Meyer, M., Copeland, R.S., Wharton, R.A., McPherson, B.A., Barnes, B.N., 2002. On the geographic origin of the Medfly *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). En Barnes, B.N (Ed.), *Proceedings of the 6th International Symposium on fruit flies of economic importance Stellenbosch, South Africa, 6-10 May 2002*, pp. 45-53.
- De Meyer, M., Ekesi, S., 2016. Fruit fly research and development in Africa- Towards a sustainable management strategy to improve horticulture. Springer. Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43226-7>
- De Meyer, M., Robertson, M.P., Peterson, A.T., Mansell, M.W., 2008. Ecological niches and potential geographical distributions of Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) and Natal fruit fly (*Ceratitidis rosa*). *J. Biogeogr.* 35, 270-281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01769.x>
- Delisle, J., 1995. Effect of male and female age on the mating success of the obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) under different ecological conditions. *J. Insect. Behav.* 8, 781-799. <https://doi.org/10.1007/BF02009506>
- Dennis A. Benson, Karen Clark, Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell, Eric W. Sayers, GenBank, *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue D1, 1 January 2014, D32-D37, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1030>
- Deschepper, P., Todd, T.N., Virgilio, M., De Meyer, M., Barr, N.B., Ruiz-Arce, R., 2021. Looking at the big picture: worldwide population structure and range expansion of the cosmopolitan pest *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae). *Biol. Invasions* 4. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02595-4>
- Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J.M., 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81-106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

- Dewsbury, D.A., 1982. Ejaculate cost and male choice. *Am. Nat.* 119, 601–610. <https://doi.org/10.1086/283938>
- Dhakal, P., Fritz, A.H., Fritz, G.N., 2018. Sperm storage patterns in doubly mated female *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 111, 55–61. <https://doi.org/10.1093/aesa/sax073>
- Dimbi, S., Maniania, N.K., Ekesi, S., 2013. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* in fruit flies and effect of fungal infection on egg laying and fertility. *Insects* 4, 206–216. <https://doi.org/10.3390/insects4020206>
- Dimbi, S., Maniania, N.K., Lux, S.A., Ekesi, S., Mueke, J.K., 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa var. fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia* 156, 375–382. <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.00000003579.48647.16>
- Dominiak, B.C., Sundaralingam, S., Jiang, L., Jessup, A.J., Nicol, H.I., 2010. Impact of marking dye, transport and irradiation on eclosion of mass produced Queensland fruit fly *Bactrocera Tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *Plant Prot. Q.* 25 (3), 141–143.
- Dowell, R. V., Worley, J., Gomes, P.J., Rendón, P., Argilés-Herrero, R., 2021. Supply, emergence and release of sterile insects. En Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and practice in area-wide Integrated Pest Management*. CRC Press, pp. 441–484.
- Drew, R.A.I., Courtice, A.C., Teakle, D.S., 1983. Bacteria as a natural source of food for adult fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 60, 279–284. <https://doi.org/10.1007/BF00376839>
- Drew, R.A.I, 1989. The Taxonomy and Distribution of Tropical and Subtropical Dacinae (Diptera: Tephritidae). En Robinson, A.S., Hooper, G. (Eds.), *Fruit Flies. Their biology, natural enemies and control* Vol. 3A. Elsevier, pp. 153–168.
- Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S., 2021. *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide Integrated Pest Management. Second Edition*. CRC Press, Boca Ranton, Florida, USA. <https://doi.org/10.1201/9781003035572>

- Eberhard, W., 1996. *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Eberhard, W.G., 2000. Sexual behavior and sexual selection in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Dacinae: Ceratitidini). En Aluja, M., Norrbom, A. (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*, CRC Press, pp. 477–489.
- Eberhard, W.G., Pereira, F., 1995. The Process of intromission in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Psyche* (Camb Mass) 102, 99–120. <https://doi.org/10.1155/1995/96054>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2019. The 2017 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 17. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5743>
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46, 387–400. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
- Ekesi, S., De Meyer, M., Mohamed, S.A., Virgilio, M., Borgemeister, C., 2016. Taxonomy, ecology, and management of native and exotic fruit fly species in Africa. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 219–238. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023603>
- Elelimy, H. A., Gabarty, A., & Negm, A. A. (2024). Evaluation of the efficacy of X-ray irradiation on male testes of Mediterranean fruit fly using light and transmission electron microscopy. *Invertebrate Reproduction & Development*, 68(1-2), 12–26. <https://doi.org/10.1080/07924259.2024.2304347>
- Engqvist, L., Dekomien, G., Lippmann, T., Epplen, J.T., Sauer, K.P., 2007. Sperm transfer and paternity in the scorpionfly *Panorpa cognata*: Large variance in traits favoured by post-copulatory episodes of sexual selection. *Evol. Ecol.* 21, 801–816. <https://doi.org/10.1007/s10682-006-9152-6>
- Enkerlin, W.R., 2021. Impact of fruit fly control programmes using the sterile insect technique. En Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, CRC Press, pp. 979–1006.

- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2011. *Ceratitis capitata* PM7/104(1). EPPO Bulletin 41, 340–346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00059.x>
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2016. Reporting Service No. 11. Details on quarantine pests in Sapin: 2015 situation.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2021. EPPO Global Database. Acceso: 10.10.2021 https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_databases/global_database
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2023. EPPO activities on plant quarantine. EPPO A1 & A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests. Acceso: 30.08.2024 https://www.eppo.int/ACTIVITIES/quarantine_activities
- Eskafi, F.M., Kolbe, M.M., 1990. Predation on larval and pupal *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the ant *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) and other predators in Guatemala. *Environ. Entomol.* 19, 148–153. <https://doi.org/10.1093/ee/19.1.148>
- Falcó Garí, J., Pérez, M., Santiago, S., Mendoza, A., Beitia, F., 2003. Rearing methods of two Braconid parasitoids used in the biological control of *Ceratitis capitata*. IOBC-WPRS (International Organisation for Biological and Integrated Control- West Palaearctic Regional Section) Bulletin 26, 99–102.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2017. Glossary of phytosanitary terms. Reference standard. ISPM/NIMP/NIMF, Publication Number 5. IPPC, FAO, Rome, Italy.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2024. FAOSTAT. Pesticides Use. Acceso: 19.04.2024 <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization), 2019. Global situation of pesticide management in agriculture and public health: Report of a 2018 WHO–FAO survey.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization). 2021. Gestión de los plaguicidas para la agricultura y

- la salud pública: Compendio de directrices y otros recursos de la FAO y la OMS. Roma. <https://doi.org/10.4060/cb3179es>
- FAO/IAEA/USDA (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ International Atomic Energy Agency/ United States Department of Agriculture), 2019. Product quality control for sterile mass-reared and released Tephritid fruit flies, Version 7.0. IAEA, Vienna, Austria.
- Farias, G.J., Cunningham, R.T., Nakagawa, S., 1972. Reproduction in the Mediterranean fruit fly: Abundance of stored sperm affected by duration of copulation and affecting egg hatch. *J. Econ. Entomol.* 65 (3), 914–915. <https://doi.org/10.1093/jee/65.3.914>
- Fernández Goya, L., Hurtado, J., Hasson, E., 2019. Female remating rate and pattern of sperm use suggest intense sperm competition in *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). *Evol. Ecol.* 33, 637–650. <https://doi.org/10.1007/s10682-019-10003-6>
- Feron, M., 1962. L'instinct de reproduction chez la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Trypetidae). Comportement sexuel. Comportement de ponte. *Rev. Pathol. Vég. Entomol. Agric. Fr.* 41, 1–129
- Fimiani, P., 1989. Pest status: Mediterranean region. En Robinson, A.S., Hooper, G. (Eds.), *World Crop Pests: Fruit Flies, Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam, pp. 300–372.
- Fischer, K., Perlick, J., Galetz, T., 2008. Residual reproductive value and male mating success: Older males do better. *Proc. Roy. Soc.-B: Biol. Sci.* 275, 1517–1524. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1455>
- Flores, S., Campos, S., Villaseñor, A., Valle, Á., Enkerlin, W., Toledo, J., Liedo, P., Montoya, P., 2013. Sterile males of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) as disseminators of *Beauveria bassiana* conidia for IPM strategies. *Biocontrol Sci. Technol.* 23, 1186–1198. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.822473>
- Fritz, A.H., 2004. Sperm storage patterns in singly mated females of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97, 1328–1335. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[1328:SSPISM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[1328:SSPISM]2.0.CO;2)

- Fritz, A.H., Dhakal, P., Fritz, G.N., Kirby, L.A., 2010. Isolating, amplifying and quantifying sperm DNA in *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 93, 63–72. <https://doi.org/10.1653/024.093.0109>
- Gabrieli, P., Scolari, F., Di Cosimo, A., Savini, G., Fumagalli, M., Gomulski, L.M., Malacrida, A.R., Gasperi, G., 2016. Sperm-less males modulate female behaviour in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 79, 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.10.002>
- Garcia, F.R.M., Gil-Santana, H.R., Oliveira, J., 2023. *Zelus pedestris* (Hemiptera: Reduviidae): a new record of predator of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Braz. J. Biol. 83, 2–3. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.248341>
- García Marí, F., García Álvarez-Coque, J.M., Mesado, J., 2002. La mosca de la fruta (*Ceratitis capitata*). Quaderns medioambientals. Fundació IVIFA (Instituto Valenciano de Investigación y Formación Agroambiental) 1, 9–37.
- García-González, F., 2004. Infertile matings and sperm competition: The effect of “nonsperm representation” on intraspecific variation in sperm precedence patterns. Am. Nat. 164, 457–472. <https://doi.org/10.1086/423987>
- Garrido, A., Ventura, J.J., 1993. Plagas de los cítricos. Bases para el manejo integrado. MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Madrid.
- Gasparich, G.E., Sheppard, W.S., Han, H. -Y, McPheron, B.A., Steck, G.J., 1995. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* populations. Insect. Mol. Biol. 4, 61–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1995.tb00008.x>
- Gava, C.A.T., Tavares, P.F. de S., Gonçalves, J.S., Paranhos, B.A.J., 2020. Applying local entomopathogenic fungi strains to the soil can control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Wiedemann adults. Biocontrol Sci. Technol. 30, 103–115. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1691716>
- Gavriel, S., Gazit, Y., Yuval, B., 2009. Remating by female Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*, Diptera: Tephritidae): Temporal patterns and modulation by male condition. J. Insect. Physiol. 55, 637–642. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.04.002>

- Generalitat Valenciana, 2024. Portal Agrari. Campañas oficiales de lucha frente a plagas. Acceso: 29.03.2024 <https://portalagrari.gva.es/es/agricultura/plagas-campanas-oficiales>
- Georghiou, G.P., 1986. Insecticide resistance: the tephritidae next?. En A.P. Economopoulos A.P. (Ed.), *Fruit flies: Proceedings of the Second International Symposium*, 16–21 September 1986, Kolymbari, Crete, Greece, 1986, pp. 27– 40.
- Georghiou P., Taylor E., 1976. Pesticide resistance as an evolutionary phenomenon. *Proceedings of the 15th International Congress of Entomology Washington, D.C.*, pp. 759-785.
- Gilchrist, A.S., Partridge, L., 2000. Why it is difficult to model sperm displacement in *Drosophila melanogaster*: the relation between sperm transfer and copulation duration. *Evolution (NY)* 54, 534–542. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00056.x>
- Gilioli, G., Sperandio, G., Colturato, M., Pasquali, S., Gervasio, P., Wilstermann, A., Dominic, A.R., Schrader, G., 2021. Non-linear physiological responses to climate change: The case of *Ceratitidis capitata* distribution and abundance in Europe. *Biol. Invasions* 9. <https://doi.org/10.1007/s10530-021-02639-9>
- Giunti, G., Benelli, G., Campolo, O., Canale, A., Kapranas, A., Liedo, P., Papadopoulos, N.T., 2023. Biology, ecology and invasiveness of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*: A review. *Entomol. Gen.* 43 (6), 1221–1239. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2023/2135>
- Gómez-Clemente, F., 1934. Los parásitos de la *Ceratitidis capitata* Wied. Nuevos ensayos de importación y aclimatación. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* 7, 69–80.
- Gómez-Clemente, F., 1932. Un ensayo de lucha biológica contra *Ceratitidis capitata* en Valencia. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* Año 6, 80–89.
- Gómez-Clemente, F., Planes, S., 1952. Algunas notas sobre la ecología de *Ceratitidis capitata* en el Levante español sobre naranjos. *Boletín de Patología Vegetal y Entomología Agrícola* 19, 37–48.
- Gowaty, P.A., 2012. The evolution of multiple mating: Costs and benefits of polyandry to females and of polygyny to males. *Fly* 6 (1), 3–11. <https://doi.org/10.4161/fly.18330>

- Guillem-Amat, A., Sánchez, L., López-Errasquín, E., Ureña, E., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. 2020. Field detection and predicted evolution of spinosad resistance in *Ceratitis capitata*. *Pest. Manag. Sci.* 76 (11), 3702-3710. <https://doi.org/10.1002/ps.5919>
- Hafsi, A., Rahmouni, R., Othman, S. Ben, Abbes, K., Elimem, M., Chermiti, B., 2020. Mass trapping and bait station techniques as alternative methods for IPM of *Ceratitis capitata* Wiedmann (Diptera: Tephritidae) in citrus orchards. *Orient. Insects* 54, 285-298. <https://doi.org/10.1080/00305316.2019.1623133>
- Hamden, H., Guerfali, M. M. S., Fadhl, S., Saidi, M., Chevrier, C., 2013. Fitness improvement of mass-reared sterile males of *Ceratitis capitata* (Vienna 8 strain) (Diptera: Tephritidae) after gut enrichment with probiotics. *J. Econ. Entomol.* 106(2), 641-647 <https://doi.org/10.1603/EC12362>
- Hanna, A.D., 1938. Studies on the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Trypetidae). The structure and operation of the reproductive organs. *Bull. Soc. Fouad. 1er. Ent.* 39-59.
- Harbo, J.R., 1975. Measuring the concentration of spermatozoa from honey bees with spectrophotometry. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 68(6):1050-1052. <https://doi.org/10.1093/aesa/68.6.1050>
- Harmer, A.M.T., Radhakrishnan, P., Taylor, P.W., 2006. Remating inhibition in female Queensland fruit flies: Effects and correlates of sperm storage. *J. Insect Physiol.* 52, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.10.003>
- Harvey, J.A., Heinen, R., Armbrecht, I., Basset, Y., Baxter-Gilbert, J.H., Bezemer, T.M., Böhm, M., Bommarco, R., Borges, P.A.V., Cardoso, P., Clausnitzer, V., Cornelisse, T., Crone, E.E., Dicke, M., Dijkstra, K.D.B., Dyer, L., Eilers, J., Fartmann, T., Forister, M.L., Furlong, M.J., Garcia-Aguayo, A., Gerlach, J., Gols, R., Goulson, D., Habel, J.C., Haddad, N.M., Hallmann, C.A., Henriques, S., Herberstein, M.E., Hochkirch, A., Hughes, A.C., Jepsen, S., Jones, T.H., Kaydan, B.M., Kleijn, D., Klein, A.M., Latty, T., Leather, S.R., Lewis, S.M., Lister, B.C., Losey, J.E., Lowe, E.C., Macadam, C.R., Montoya-Lerma, J., Nagano, C.D., Ogan, S., Orr, M.C., Painting, C.J., Pham, T.H., Potts, S.G., Rauf, A., Roslin, T.L., Samways, M.J., Sanchez-Bayo, F., Sar, S.A., Schultz, C.B., Soares, A.O., Thancharoen, A., Tschartnke, T., Tylianakis, J.M., Umbers, K.D.L., Vet, L.E.M.,

- Visser, M.E., Vujic, A., Wagner, D.L., WallisDeVries, M.F., Westphal, C., White, T.E., Wilkins, V.L., Williams, P.H., Wyckhuys, K.A.G., Zhu, Z.R., de Kroon, H., 2020. International scientists formulate a roadmap for insect conservation and recovery. *Nat. Ecol. Evol.* 4, 174–176. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1079-8>
- Harwood, J.F., Chen, K., Liedo, P., Müller, H.G., Wang, J.L., Morice, A.E., Carey, J.R., 2015. Female access and diet affect insemination success, senescence and the cost of reproduction in the male Mexican fruit fly *Anastrepha ludens*. *Physiol. Entomol.* 40, 65–71. <https://doi.org/10.1111/phen.12089>
- Hassan S.A. 1994. Activities of the IOBC working group “Pesticides and beneficial organisms”. *IOBC/WPRS Bull.* 17(10): 1-5.
- Helinski, M.E.H., Knols, B.G.J., 2009. Sperm quantity and size variation in un-irradiated and irradiated males of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* Patton. *Acta Trop.* 109, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.10.002>
- Hendrichs, J., Hendrichs, M.A., 1990. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in nature: Location and diel pattern of feeding and other activities on fruiting and nonfruiting hosts and nonhosts. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83, 632–641. <https://doi.org/10.1093/aesa/83.3.632>
- Hendrichs, J., Katsoyannos, B.I., Papaj, D.R., Prokopy, R.J., 1991. Sex differences in movement between natural feeding and mating sites and tradeoffs between food consumption, mating success and predator evasion in Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 86, 223–231. <https://doi.org/10.1007/BF00317534>
- Hendrichs, J., Ortiz, G., Liedo, P., Schwarz, A., 1983. Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. En Cavalloro, R. (Ed.), *Fruit Flies of Economic Importance*, A.A. Balkema Rotterdam, pp. 353–365.
- Hendrichs, J., Pereira, R., Vreysen, M.J.B., 2021a. Area-wide integrated pest management. Development and field application. CRC Press, Boca Raton (USA). <https://doi.org/10.1201/9781003169239-15>
- Hendrichs, J., Robinson, A.S., Cayol, J.P., Enkerlin, W., 2002. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or

- eradication: The importance of mating behaviour studies. *Fla. Entomol. Soc.* 85, 1–13. <https://doi.org/10.1653/0015>
- Hendrichs, J., Vreysen, J. M. B., Enkerlin, W, R, Cayol, J. P., 2021. Strategic options in using sterile insects for area-wide integrated pest management. En Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. CRC. Press. pp. 842–884.
- Hernández-Ortiz, V., Hernández-López, M., Steck, G., 2020. Morfología y taxonomía de Tephritidae: Especies de importancia económica y cuarentenaria en América. En Montoya, P., Toledo, J., Hernández, E. (Eds.), *Moscas de la fruta: Fundamentos y procedimientos para su manejo*, S y G Editores, Ciudad de México, pp. 71–116.
- Herrera-Cruz, M., Abraham, S., Nuñez-Beverido, N., Flores-Estévez, N., Reyes-Hernández, M., Alvarado, M., Pérez-Staples, D., 2017. Male age and strain affect ejaculate quality in the Mexican fruit fly. *Insect. Sci.* 25, 703–711. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12446>
- Himuro, C., Fujisaki, K., 2015. Effects of mating duration on female reproductive traits of the seed bug *Togo hemipterus* (Heteroptera: Lygaeidae). *Appl. Entomol. Zool.* 50, 491–496. <https://doi.org/10.1007/s13355-015-0357-4>
- Holland, J.M., Bianchi, F.J., Entling, M.H., Moonen, A.C., Smith, B.M., Jeanneret, P., 2016. Structure, function and management of semi-natural habitats for conservation biological control: a review of European studies. *Pest. Manag. Sci.* 72, 1638–1651. <https://doi.org/10.1002/ps.4318>
- Hooper, G.H.S., 1971. Competitiveness of gamma-sterilized males of the Mediterranean fruit fly: Effect of irradiating pupal or adult stage and of irradiating pupae in nitrogen. *J. Econ. Entomol.* 64, 1364–1368. <https://doi.org/10.1093/jee/64.6.1364>
- Hooper, G.H.S., 1972. Sterilization of the Mediterranean fruit fly with gamma radiation: Effect on male competitiveness and change in fertility of females alternately mated with irradiated and untreated males. *J. Econ. Entomol.* 65, 1–6. <https://doi.org/10.1093/jee/65.1.1>
- Hooper, G.H.S., 1989. The effect of ionizing radiation on reproduction. En

- Robinson, A.S., Hooper, G. (Eds.), *Fruit Flies. Their biology, natural enemies and control* Vol. 3A. Elsevier, pp. 153–168.
- IAEA (International Atomic Energy Agency), 2024a. International Database on Insect Disinfestation and Sterilization (IDIDAS). Acceso: 28.02.2024 <http://www-ididas.iaea.org/ididas/>
- IAEA (International Atomic Energy Agency), 2024b. International Database on Insect Disinfestation and Sterilization (IDIDAS). *Ceratitis capitata*. Acceso: 28.02.2024 <https://nucleus.iaea.org/sites/naipc/ididas/Pages/DisplayEntity.aspx?EntityID=832>
- Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Gestión Integrada de Plagas y Enfermedades en cítricos. Efectos Secundarios. Acceso: 03.03.2024 <http://gipcitricos.ivia.es/area/efectos-secundarios>
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), 2024. Alerta sobre resistencias de *Ceratitis capitata* en cítricos. Acceso: 31.08.2024 <https://irac-online.org/documents/resistencia-de-ceratitis-capitata-en-citricos-alerta/>
- Israely, N., Yuval, B., Kitron, U., Nestel, D., 1997. Population fluctuations of adult Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a Mediterranean heterogeneous agricultural region. *Environ. Entomol.* 26, 1263–1269. <https://doi.org/10.1093/ee/26.6.1263>
- Itô, Y., Yamagishi, M., 1989. Sperm competition in the melon fly, *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): Effects of sequential matings with normal and virgin or non-virgin sterile males. *Appl. Entomol. Zool.* 466–477. <https://doi.org/10.1303/aez.24.466>
- Jacas, J. A., Urbaneja, A., & Viñuela, E. 2006. History and future of introduction of exotic arthropod biological control agents in Spain: a dilemma? *BioControl*, 51, 1-30. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-5808-3>
- Jackson, C.G., Long, J.P., Klungness, L.M., 1998. Depth of pupation in four species of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in sand with and without moisture. *J. Econ. Entomol.* 91, 138–142. <https://doi.org/10.1093/jee/91.1.138>
- James, M., Malan, A.P., Addison, P., 2018. Surveying and screening South African entomopathogenic nematodes for the control of the Mediterranean fruit

- fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). *Crop Protection* 105, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.008>
- Jang, E.B., 1995. Effects of mating and accessory gland injections on olfactory-mediated behavior in the female mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *J. Insect Physiol.* 41, 705–710. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00015-M](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00015-M)
- Jones, J.C., 1973. A Study on the fecundity of male *Aedes aegypti*. *J. Insect Phisiol.* 19, 435–439.
- Juan-Blasco, M., Sabater-Muñoz, B., Argilés, R., Jacas, J.A., Castañera, P., Urbaneja, A., 2013a. Molecular tools for sterile sperm detection to monitor *Ceratitidis capitata* populations under SIT programmes. *Pest Manag. Sci.* 69, 857–864. <https://doi.org/10.1002/ps.3448>
- Juan-Blasco, M., Sabater-Munõz, B., Pla, I., Argilés, R., Castañera, P., Jacas, J.A., Ibáñez-Gual, M. V., Urbaneja, A., 2014. Estimating SIT-driven population reduction in the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, from sterile mating. *Bull. Entomol. Res.* 104, 233–242. <https://doi.org/10.1017/S0007485313000692>
- Juan-Blasco, M., San Andrés, V., Martínez-Utrillas, M.A., Argilés, R., Pla, I., Urbaneja, A., Sabater-Muñoz, B., 2013b. Alternatives to ginger root oil aromatherapy for improved mating performance of sterile *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) males. *J. Appl. Entomol.* 137, 244–251. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01688.x>
- Juan-Blasco, M., Urbaneja, A., San Andrés, V., Castañera, P., Sabater-Muñoz, B., 2013c. Improving the sterile sperm identification method for its implementation in the area-wide sterile Insect Technique Program against *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Spain. *J. Econ. Entomol.* 106, 2541–2547. <https://doi.org/10.1603/EC13064>
- Kapranas, A., Chronopoulou, A., Lytra, I.C., Peters, A., Milonas, P.G., Papachristos, D.P., 2021. Efficacy and residual activity of commercially available entomopathogenic nematode strains for Mediterranean fruit fly control and their ability to infect infested fruits. *Pest Manag. Sci.* 77, 3964–3969. <https://doi.org/10.1002/ps.6416>
- Karagoz, M., Gulcu, B., Hazir, C., Kaya, H.K., Hazir, S., 2009. Biological control potential of Turkish entomopathogenic nematodes against the

- Mediterranean fruit fly *Ceratitits capitata*. *Phytoparasitica* 37, 153–159. <https://doi.org/10.1007/s12600-008-0020-5>
- Kaspi, R., 2000. Attraction of female *Chiracanthium mildei* (Araneae: Clubionidae) to olfactory cues from male mediterranean fruit flies *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritida). *BioControl* 45, 463–468. <https://doi.org/10.1023/A:1026593004360>
- Kaspi, R., Taylor, P.W., Yuval, B., 2000. Diet and size influence sexual advertisement and copulatory success of males in Mediterranean fruit fly leks. *Ecol. Entomol.* 25, 279–284. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2000.00266.x>
- Katiyar, K.P., Ramirez, E., 1970. Mating frequency and fertility of Mediterranean fruit fly females alternately mated with normal and irradiated males. *J. Econ. Entomol.* 63, 1247–1250. <https://doi.org/10.1093/jee/63.4.1247>
- Knipling, E.F., 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* 48 (4), 459–462. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>
- Konstantopoulou, M.A., Mazomenos, B.E., 2005. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitits capitata*. *BioControl* 50, 293–305. <https://doi.org/10.1007/s10526-004-0458-4>
- Koppert: Biological Systems, 2024. Efectos Secundarios. Acceso: 03.03.2024 <https://efectos-secundarios.koppert.es/>
- Koressaar, T., Remm. M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Korneyev, V.A., Mishustin, R.I., Korneyev, S. V., 2017. The Carpomyini fruit flies (Diptera: Tephritidae) of Europe, Caucasus, and Middle East: New records of pests with improved keys. *Vestn. Zool.* 51, 453–470. <https://doi.org/10.2478/vzoo-2017-0056>
- Kouloussis, N.A., Damos, P.T., Ioannou, C.S., Tsitsoulas, C., Papadopoulos, N.T., Nestel, D., Koveos, D.S., 2017. Age related assessment of sugar and protein intake of *Ceratitits capitata* in *ad libitum* conditions and modeling its

- relation to reproduction. *Front. Physiol.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00271>
- Kraaijeveld, K., Chapman, T., 2004. Effects of male sterility on female remating in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Proc. Roy. Soc.-B: Biol. Sci.* 271, 209–211. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0116>
- Kraaijeveld, K., Katsoyannos, B.I., Stavrinides, M., Kouloussis, N.A., Chapman, T., 2005. Remating in wild females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Anim. Behav.* 69, 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.06.015>
- Krueger, S., Jilge, M., Mound, L., Moritz, G.B., 2017. Reproductive behavior of *Echinothrips americanus* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Insect Sci.* 17, 66. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex043>
- Kuba, H., Itô, Y., 1993. Remating inhibition in the melon fly, *Bactrocera* (= *Dacus*) *cucurbitae* (Diptera: Tephritidae): Copulation with spermless males inhibits female remating. *J. Ethol.* 11, 23–28. <https://doi.org/10.1007/BF02350002>
- Laborda, R., Bagues, L., Navarro, C., Montoro, E., Llopis, E., Barajas, O., Arroyo, M., García, E.M., Martínez, A., Sayaguéz, J.M., 2002. Efecto de las aplicaciones de nematodos entomopatógenos para el control de la mosca del mediterráneo. *Phytoma España* 160–161.
- Laborda, R., Santaballa, E., García Mari, F., 1990. Evolución y desarrollo de la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* Wied. sobre limones españoles. *Bol. Sanid. Veg. Plagas* 16, 613–618.
- LaChance, L.E., 1967. The induction of dominant lethal mutations in insects by ionizing radiation and chemicals—as related to the sterile male technique of insect control. En Wright, J. W., Pal, R. (Eds.), *Genetics of Insect Vectors of Disease*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 617–650.
- Lance, D.R., McInnis, D.O., 2021. Biological basis of the Sterile Insect Technique. En Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide Integrated Pest Management*, CRC Press, pp. 355–398.
- Liimatainen, J., Hoikkala, A., Shelly, T., 1997. Courtship behavior in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Comparison of wild and mass-reared males. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 9 (6), 836–843. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.6.836>

- Llorens Climent, J.M., Martín Gil, Á., 2022. Guía de gestión integrada de plagas. Cítricos. MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).
- Locke, S.J., Peng, Y.-S., Cross, N.L., 1990. A supravital staining technique for honey bee spermatozoa. *Physiol. Entomol.* 15, 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00506.x>
- López Munguira, M., Muñiz Daza, M., Salom Bonet, F., 1983. Estudio morfológico del aparato reproductor femenino de *Ceratitis capitata* Wied. (Dipt.: Trypetidae). *Bol. Sanid. Veg. Plagas* 9, 31–44.
- López-Muñoz, L., López, E.F., Feliciano, C.A., Soto, D.N., Pérez-Staples, D., 2018. Identification of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) sperm from females in traps: The importance of the ventral receptacle. *J. Econ. Entomol.* 111, 491–494. <https://doi.org/10.1093/jee/tox298>
- Lorch, P.D., Wilkinson, G.S., Reillo, P.R., 1993. Copulation duration and sperm precedence in the stalk-eyed fly *Cyrtodiopsis whitei* (Diptera: Diopsidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 32, 303–311. <https://doi.org/10.1007/BF00183785>
- Lux, S.A., Vilaridi, J.C., Liedo, P., Gaggli, K., Calcagno, G.E., Munyiri, F.N., Vera, M.T., Manso, F., 2002. Effects of Irradiation on the courtship behavior of Medfly (Diptera, Tephritidae) mass reared for the Sterile Insect Technique. *Fla. Entomol.* 85 (1), 102–112.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Castañera, P., 2007. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*, *J. Econ. Entomol.* 100 (6), 1836–1843. <https://doi.org/10.1093/jee/100.6.1836>
- Mahmood, K., 2004. Identification of pest species in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) species complex. *Pak. J. Zool.*, 36, 219–230.
- Malacrida, A.R., Gomulski, L.M., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G., Guglielmino, C.R., 2007. Globalization and fruitfly invasion and expansion: The medfly paradigm. *Genetica* 131, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9117-2>
- Malacrida, A.R., Guglielmino, C.R., Gasperi, G., Baruffi, L., Milani, R., 1992. Spatial temporal differentiation in colonizing populations of *Ceratitis capitata*. *Heredity (Edinb)* 69, 101–111. <https://doi.org/10.1038/hdy.1992.102>

- Malan, A.P., Manrakhan, A., 2009. Susceptibility of the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*) and the Natal fruit fly (*Ceratitidis rosa*) to entomopathogenic nematodes. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 47-49. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.09.007>
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 2024a. Registro de Productos Fitosanitarios. Acceso: 11.01.2024 <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-productos/>
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), 2024b. Registro de determinados medios de defensa fitosanitaria (MDF). Acceso: 11.01.2024 <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-determinados-medios-de-defensa-fitosanitaria/>
- Marchini, D., Bene, G. D., 2006. Comparative male reproductive accessory glands in *Bactrocera oleae* and *Ceratitidis capitata* (Diptera, Tephritidae). *J. Zool.* 73 (1),15-25. <https://doi.org/10.1080/11250000500502319>
- Marchini, D., Bene, G., Falso, L.F., Dallai, R., 2001a. Structural organization of the copulation site in the medfly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) and observations on sperm transfer and storage. *Arthropod Struct. Dev.* 30, 39-54. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(01\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(01)00018-4)
- Marchini, D., Del Bene, G., Cappelli, L., Dallai, R., 2003. Ultrastructure of the male reproductive accessory glands in the medfly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) and preliminary characterization of their secretions. *Arthropod Struct. Dev.* 31, 313-327. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(03\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(03)00003-3)
- Marchini, D., Del Bene, G., Falso, L.F., Dallai, R., 2001b. Structural organization of the copulation site in the medfly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) and observations on sperm transfer and storage. *Arthropod Struct. Dev.* 30, 39-54. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(01\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(01)00018-4)
- Marchini, L.C., 1982. Laboratory studies on oviposition, and on the structure of the ovipositor, in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wied.). Tesis Doctoral. The University of Manchester, United Kingdom.

- Marshall, S.A., 2012. Flies: The natural history and diversity of Diptera. Firefly Books Ltd., Buffalo, New York.
- Martínez, I., Hernández-Ortiz, V., 1997. Anatomy of the reproductive system in six *Anastrepha* species and comments regarding their terminology in Tephritidae (Diptera). Proc. Entomol. Soc. Wash. 99 (4), 727-743.
- Martínez, I., Hernández-Ortiz, V., Luna, L.R., 1995. Desarrollo sexual en *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Acta Zool. Mex. 65, 75-88.
- Martínez-Ferrer, M.T., Campos, J.M., Fibla, J.M., Martínez-Ferrer, M.T., Campos, J.M., Fibla, J.M., 2010. Field efficacy of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) mass trapping technique on clementine groves in Spain. J. Appl. Entomol. 136, 181-190. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2011.01628.x>
- Martínez-Ferrer, M.T., Navarro, C., Campos, J.M., Marzal, C., Fibla, J.M., Bargues, L., García-Marí, F., 2010. Seasonal and annual trends in field populations of Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, in Mediterranean citrus groves: comparison of two geographic areas in eastern Spain. Span. J. of Agric. Res. 8 (3), 757-765. <https://doi.org/10.5424/sjar/2010083-1275>
- McAlpine, J.F., 1981. Morphology and terminology - adults. En McAlpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, H.J., J.R.V., Wood, D.M. (Eds.), *Manual of Nearctic Diptera*, pp. 9-63.
- McClintock, B., 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. Genetics 26 (2), 234-282. <https://doi.org/10.1093/genetics/26.2.234>
- McDonald, P.T., McInnis, D.O., 1985. *Ceratitis capitata*: Effect of host fruit size on the number of eggs per clutch. Entomol. Exp. Appl. 37, 207-211. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03476.x>
- McInnis, D.O., 1993. Size differences between normal and irradiated sperm heads in mated female mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 86, 305-308. <https://doi.org/10.1093/aesa/86.3.305>
- McInnis, D.O., Rendon, P., Komatsu, J., 2002. Mating and remating of Medflies (Diptera: Tephritidae) in Guatemala: Individual fly marking in field cages. Fla. Entomol. 85, 126-137. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0126:maromd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0126:maromd]2.0.co;2)

- McInnis, D.O., Tam, S., Grace, C., Miyashita, D., 1994. Population suppression and sterility rates induced by variable sex ratio, sterile insect releases of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87 (2), 231–240. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.2.231>
- Medina, P., Corrales, E., González-Nuñez, M., Smagghe, G., Viñuela, E., 2008. Effect of *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis* and *Steinernema feltiae* on the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* and the very sensitive braconid *Psytalia concolor* in the lab. *Pesticides and Beneficial Organisms IOBC/WPRS Bulletin* 35, 113–121.
- MAPA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación), 2020. Programa Nacional para la aplicación de la normativa fitosanitaria. Plan Nacional de Contingencia de Tefrítidos No Europeos.
- Miyatake, T., Chapman, T., Partridge, L., 1999. Mating-induced inhibition of remating in female mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata*. *J. Insect. Physiol.* 45, 1021–1028. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00083-9)
- Mockford, A., Urbaneja, A., Tena, A., Ashbrook, K., Westbury, D.B., 2019. Aumento de la abundancia y diversidad de enemigos naturales en cítricos mediante el manejo de cubiertas vegetales. *Phytoma España* 310, 102–105.
- Moner, J.P., Petit, V.R., Bernat, J.M., 1988. La mosca de las frutas (*Ceratitis capitata* Wied.). Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca, Servei de Protecció dels Vegetals, pp. 60.
- Montoya, P., Flores, S., Campos, S., Liedo, P., Toledo, J., 2020. Simultaneous use of SIT plus disseminator devices of *Beauveria bassiana* enhances horizontal transmission in *Anastrepha ludens*. *J. Appl. Entomol.* 144, 509–518. <https://doi.org/10.1111/jen.12766>
- Monzó, C., Mollá, Ó., Castañera, P., Urbaneja, A., 2009. Activity-density of *Pardosa cribata* in Spanish citrus orchards and its predatory capacity on *Ceratitis capitata* and *Myzus persicae*. *BioControl* 54, 393–402. <https://doi.org/10.1007/s10526-008-9199-0>
- Monzó, C., Sabater-Muñoz, B., Urbaneja, A., Castañera, P., 2011. The ground beetle *Pseudophonus rufipes* revealed as predator of *Ceratitis capitata* in citrus orchards. *Biological Con.* 56, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.09.004>

- Moore, A.J., Gotway, P.A., Wallin, W.G., Moore, P.J., 2001. Sexual conflict and the evolution of female mate choice and male social dominance. *Proc. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* 268, 517–523. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1399>
- Mossinson, S., Yuval, B., 2003. Regulation of sexual receptivity of female Mediterranean fruit flies: Old hypotheses revisited and a new synthesis proposed. *J. Insect. Physiol.* 49, 561–567. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00027-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00027-1)
- Msaad Guerfali, M., Chevrier, C., 2020. Determinant factors for sperm transfer and sperm storage within *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and impact on Sterile Insect Technique. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 13, 792–807. <https://doi.org/10.1080/16878507.2020.1855901>
- M'saad Guerfali, M., Parker, A., Fadhil, S., Hemdane, H., Raies, A., Chevrier, C., 2011. Fitness and reproductive potential of irradiated mass-reared Mediterranean fruit fly males *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Lowering radiation doses. *Fla. Entomol.* 94, 1042–1050. <https://doi.org/10.1653/024.094.0443>
- Muller, H.J., 1954. The nature of the genetic effects produced by irradiation. En Hollaender, A. (Ed.), *Radiation Biology*, Vol. I, Chap. 7, pp. 351–473.
- Muller, H.J., 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* 66 (1699), 84–87. <https://doi.org/doi:10.1126/science.66.1699.84>
- Naeole, C.K.M., Haymer, D.S., 2003. Use of oligonucleotide arrays for molecular taxonomic studies of closely related species in the Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*) complex. *Mol. Ecol. Notes* 3 (4), 662–665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00545.x>
- Nakagawa, S., Farias, G.J., Suda, D., Cunningham, R.T., Chambers, D.L., 1971. Reproduction of the Mediterranean fruit fly: frequency of mating in the laboratory. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 64 (4), 949–950. <https://doi.org/10.1093/aesa/64.4.949>
- Navarro, C., Alcaide, J., Bargues, L., Marzal, C., Mai, F.G., 2008. Evolución del tamaño y edad fisiológica de los adultos en poblaciones de campo de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). Aplicación al análisis de su ciclo biológico. *Bol. San. Veg. Plagas.* Vol. 34 N°2, 219–228.

- Navarro-Llopis, V., Alfaro, C., Primo, J., Vacas, S., 2011. Response of two tephritid species, *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*, to different emission levels of pheromone and parapheromone. *Crop Prot.* 30, 913–918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.03.007>
- Navarro-Llopis, V., Alfaro, F., Domínguez, J., Sanchis, J., Primo, J., 2008. Evaluation of traps and lures for mass trapping of Mediterranean fruit fly in citrus groves. *J. Econ. Entomol.* 101, 126–131. <https://doi.org/10.1093/jee/101.1.126>
- Navarro-Llopis, V., Domínguez-Ruiz, J., Zarzo, M., Alfaro, C., Primo, J., 2010. Mediterranean fruit fly suppression using chemosterilants for area-wide integrated pest management. *Pest. Manag. Sci.* 66, 511–519. <https://doi.org/10.1002/ps.1901>
- Navarro-Llopis, V., Primo, J., Vacas, S., 2013. Efficacy of attract-and-kill devices for the control of *Ceratitis capitata*. *Pest. Manag. Sci.* 69, 478–482. <https://doi.org/10.1002/ps.3393>
- Navarro-Llopis, V., Vacas, S., 2014. Mass trapping for fruit fly control. En Shelly, T., Epsky, N., Jang, E.B., Reyes-Flores, J., Vargas, R., *Trapping and the detection, control, and regulation of Tephritid fruit flies. Lures, area-wide programs, and trade implications.* Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 512–559 <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9193-9>
- Nyamukondiwa, C., Kleynhans, E., Terblanche, J.S., 2010. Phenotypic plasticity of thermal tolerance contributes to the invasion potential of Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*). *Ecol. Entomol.* 35, 565–575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01215.x>
- Nyamukondiwa, C., Weldon, C.W., Chown, S.L., le Roux, P.C., Terblanche, J.S., 2013. Thermal biology, population fluctuations and implications of temperature extremes for the management of two globally significant insect pests. *J. Insect. Physiol.* 59, 1199–1211. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.09.004>
- Oerke, E.C., 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Oerke, E.C., Dehne, H.W., Schönbeck, F., Weber, A., 1999. *Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops.* Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.

- Ohinata, K., Fujimoto, M., Higa, H., Tanaka, N., Harris, E.J., 1978. Mediterranean fruit fly: Gamma-irradiation in nitrogen and packaging for sterile-insect release program in Los Angeles. *J. Econ. Entomol.* 71 (44), 610–612. <https://doi.org/10.1093/jee/71.4.610>
- Oliveira, C.M., Auad, A.M., Mendes, S.M., Frizzas, M.R., 2013. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. *J. Appl. Entomol.* 137, 1–15. <https://doi.org/10.1111/jen.12018>
- Orozco, D., Lopez, R.O., 1993. Mating competitiveness of wild and laboratory mass-reared Medflies: Effect of male size. En Aluja, M., Liedo, P. (Eds.) *Fruit Flies*. Springer, New York, NY, pp. 185–188. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2278-9_34
- Otronen, M., 1997. Sperm numbers, their storage and usage in the fly *Dryomyza anilis*. *Proc. Roy. Soc.-B: Biol. Sci.* 264, 777–782. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0110>
- Papadopoulos, N.T., Carey, J.R., Katsoyannos, B.I., Kouloussis, N.A., 1996. Overwintering of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Northern Greece. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89, 526–534. <https://doi.org/10.1093/aesa/89.4.526>
- Papadopoulos, N.T., Katsoyannos, B.I., Kouloussis, N.A., Carey, J.R., Müller, H.-G., Zhang, Y., 2004. High sexual signalling rates of young individuals predict extended life span in male Mediterranean fruit flies. *Oecologia* 138, 127–134. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1392-3>
- Papanastasiou, S.A., Diamantidis, A.D., Nakas, C.T., Carey, J.R., Papadopoulos, N.T., 2011. Dual reproductive cost of aging in male medflies: Dramatic decrease in mating competitiveness and gradual reduction in mating performance. *J. Insect. Physiol.* 57, 1368–1374. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.004>
- Papanicolaou, A., Schetelig, M.F., Arensburger, P., Atkinson, P.W., Benoit, J.B., Bourtzis, K., Castañera, P., Cavanaugh, J.P., Chao, H., Childers, C., Curril, I., Dinh, H., Doddapaneni, H.V., Dolan, A., Dugan, S., Friedrich, M., Gasperi, G., Geib, S., Georgakilas, G., Gibbs, R.A., Giers, S.D., Gomulski, L.M., González-Guzmán, M., Guillem-Amat, A., Han, Y., Hatzigeorgiou, A.G., Hernández-Crespo, P., Hughes, D.S.T., Jones, J.W., Karagkouni, D., Koskinioti, P., Lee,

- S.L., Malacrida, A.R., Manni, M., Mathiopoulos, K., Meccariello, A., Murali, S.C., Murphy, T.D., Muzny, D.M., Oberhofer, G., Ortego, F., Paraskevopoulou, M.D., Poelchau, M., Qu, J., Reczko, M., Robertson, H.M., Rosendale, A.J., Rosselot, A.E., Saccone, G., Salvemini, M., Savini, G., Schreiner, P., Scolari, F., Siciliano, P., Sim, S.B., Tsiamis, G., Ureña, E., Vlachos, I.S., Werren, J.H., Wimmer, E.A., Worley, K.C., Zacharopoulou, A., Richards, S., Handler, A.M., 2016. The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species. *Genome Biol.* 17, 1–31. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1049-2>
- Pape, T., Blagoderov, V., Mostovski, M.B., 2011. Order Diptera Linnaeus. En Zhang, Z.Q. (Ed.), *An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* 3148 (Monograph), pp. 222–229. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3148.1.42>
- Parker, A., Mehta, K., 2007. Sterile insect technique: A model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Fla. Entomol.* 90, 88–95. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2007\)90\[88:SITAMF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2007)90[88:SITAMF]2.0.CO;2)
- Pascini, A.T. V, Martins, G.F., 2013. The fine structure of the spermatheca in *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106 (6), 857–867. <https://doi.org/10.1603/AN13079>
- Pascini, T. V., Martins, G.F., 2017. The insect spermatheca: an overview. *Zoology* 121, 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.12.001>
- Paynter, E., Baer-Imhoof, B., Linden, M., Lee-Pullen, T., Heel, K., Rigby, P., Baer, B., 2014. Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera*. *Cytom. Part A.* 85, 463–472. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22462>
- Peñarrubia-María, E., Avilla, J., Escudero-Colomar, L.A., 2012. Survival of wild adults of *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) under natural winter conditions in North East Spain. *Psyche (Camb. Mass.)*. Vol. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/497087>
- Perez-Hedo, M., Rivera-Perez, C., Noriega, F.G., 2014. Starvation increases insulin sensitivity and reduces juvenile hormone synthesis in mosquitoes. *PLoS One* 9 (4), e97054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086183>

- Pérez-Staples, D., Abraham, S., 2023. Postcopulatory Behavior of Tephritid Flies. *Annu. Rev. Entomol.* 68, 89–108. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-113618>
- Perez-Staples, D., Aluja, M., 2006. Sperm allocation and cost of mating in a tropical tephritid fruit fly. *J. Insect. Physiol.* 52, 839–845. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.05.007>
- Pérez-Staples, D., Aluja, M., 2004. *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) females that mate with virgin males live longer. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97, 1336–1341. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[1336:ASDTFT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[1336:ASDTFT]2.0.CO;2)
- Pérez-Staples, D., Córdova-García, G., Aluja, M., 2014. Sperm dynamics and cryptic male choice in tephritid flies. *Anim. Behav.* 89, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.12.016>
- Perez-Staples, D., Harmer, A.M.T., Taylor, P.W., 2007. Sperm storage and utilization in female Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*). *Physiol. Entomol.* 32, 127–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2006.00554.x>
- Pérez-Staples, D., Shelly, T.E., Yuval, B., 2013. Female mating failure and the failure of “mating” in sterile insect programs. *Entomol. Exp. Appl.* 146, 66–78. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01312.x>
- Pérez-Staples, D., Weldon, C.W., Radhakrishnan, P., Prenter, J., Taylor, P.W., 2010. Control of copula duration and sperm storage by female Queensland fruit flies. *J. Insect. Physiol.* 56, 1755–1762. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.07.005>
- Plá, I., García de Oteyza, J., Tur, C., Martínez, M.Á., Laurín, M.C., Alonso, E., Martínez, M., Martín, Á., Sanchis, R., Navarro, M.C., Navarro, M.T., Argilés, R., Briasco, M., Dembilio, Ó., Dalmau, V., 2021. Sterile insect technique programme against mediterranean fruit fly in the valencian community (Spain). *Insects* 12, 1–15. <https://doi.org/10.3390/insects12050415>
- Pla, N., Dembilio, Ó., Peris, R., et al., 2018. Control de la mosca mediterránea de la fruta en cítricos. *Vida Rural* 452, 50–56.
- Plant Health Australia, 2024. Fruit Fly Identification Australia. Acceso: 22.09.2023 <https://fruitflyidentification.org.au/lookup-species/>

- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Primo-Millo, E., Alfaro-Lassala, F., Argilés-Herrero, R., 2003. Plan de actuación contra la mosca de las frutas (*Ceratitis capitata*) en la Comunidad Valenciana. *Phytoma España* 153, 127–130.
- Prokopy, R.J., Hendrichs, J., 1979. Mating Behavior of *Ceratitis capitata* on a Field-Caged Host Tree. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72, 642–648. <https://doi.org/10.1093/aesa/72.5.642>
- Proverbs, D., 1968. Induced sterilization and control of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 14, 81–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.000501>
- Qazi, M.C.B., Herbeck, J.T., Lewis, S.M., 1996. Mechanisms of sperm transfer and storage in the Red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89, 892–897.
- Quesada-Moraga, E., Martín-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., Santiago-Álvarez, C., 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biol. Control* 47, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.07.002>
- Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., Santiago-Álvarez, C., 2006. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 1955–1966. <https://doi.org/10.1093/jee/99.6.1955>
- Radhakrishnan, P., Pérez-Staples, D., Weldon, C.W., Taylor, P.W., 2009. Multiple mating and sperm depletion in male Queensland fruit flies: effects on female remating behaviour. *Anim. Behav.* 78, 839–846. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.07.002>
- Ramírez y Ramírez, F., Salvador-Figueroa, M., Rosas-Quijano, R., Cruz-López, L., Toledo, J., Quintero-Fong, L., 2022. Sexual performance and survival of males of *Ceratitis capitata* Vienna 8 (Diptera: Tephritidae) inoculated with a commercial formulation of *Beauveria bassiana*. *J. Appl. Entomol.* 146, 67–76. <https://doi.org/10.1111/jen.12935>

- Reichardt, A.K., Wheeler, D.E., 1995. Estimation of sperm numbers in insects by fluorometry. *Ins. Soc.* 42, 449–452. <https://doi.org/10.1007/BF01242172>
- Reyes-Hernández, M., Pérez-Staples, D., 2017. Mating senescence and male reproductive organ size in the Mexican fruit fly. *Physiol. Entomol.* 42, 26–35. <https://doi.org/10.1111/phen.12160>
- Robinson, A.S., 2021. Genetic basis of the sterile insect technique. En Dyck, V.A., Hendrichs, J., Robinson, A.S. (Eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and practice in area-wide Integrated Pest Management*. CRC Press, pp. 144–162. https://doi.org/10.1007/1-4020-4051-2_4
- Rohde, C., Mertz, N.R., Junior, A.M., 2020. Entomopathogenic nematodes on control of mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Rev. Caatinga* 33 (4), 974–984. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n412rc>
- Ros Amador, J.P., 1988. La mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wied.) Biología y métodos de control. MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Hojas Divulgadoras N°8/88.
- Rosler, Y., Ravins, E., Gomes, P.J., 2000. Sterile insect technique (SIT) in the near east - A transboundary bridge for development and peace. *J. Crop. Prot.* 19, 733–738. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00097-1)
- Rugman-Jones, P.F., Eady, P.E., 2007. Conspecific sperm precedence in *Callosobruchus subinnotatus* (Coleoptera: Bruchidae): Mechanisms and consequences. *Proc. Roy. Soc.-B: Biol. Sci.* 274, 983–988. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0343>
- Ruiz-Castro, A., 1945. Fauna entomológica de la vid en España. Estudio sistemático-biológico de las especies de mayor importancia económica. Vol. III (Diptera). Instituto Español de Entomología.
- Rzymiski, P., Langowska, A., Fliszkiewicz, M., Poniedziałek, B., Karczewski, J., Wiktorowicz, K., 2012. Flow cytometry as an estimation tool for honey bee sperm viability. *Theriogenology* 77, 1642–1647. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.009>
- Sabater-Muñoz, B., Martins, D.S., Skouri, W., Laurín, C., Tur, C., Beitia, F., 2009. Primeros ensayos sobre la utilización de *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera,

- Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae) en la Comunidad Valenciana. *Levante Agrícola* 398, 372–376.
- Sabater-Muñoz, B., Tormos, J., Pedro, L. De, Harbi, A., Tur, C., Briasco, M., Jesús, M., Beitia, F.J., 2012. Estrategias de control integrado de *Ceratitis capitata* en cítricos. *Vida Rural* 1, 42–45.
- Sakaluk, S.K., O'Day, D.H., 1984. Hoechst staining and quantification of sperm in the spermatophore and spermatheca of the decorated cricket, *Grylloides supplicans* (Orthoptera: Gryllidae). *Can. Entomol.* 116, 1585–1589. <https://doi.org/10.4039/Ent114769-9>
- San Andrés, V., Urbaneja, A., Sabater-Muñoz, B., Castañera, P., 2007. A Novel molecular approach to assess mating success of sterile *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) males in Sterile. *J. Econ. Entomol.* 100 (4), 1444–1449. <https://doi.org/10.1093/jee/100.4.1444>
- Santos, M.D., Hanel, A., Mastrangelo, T., Lopes, L.A., Silva, E.S., Morales, G.J., 2017. Predação e oviposição de *Macrocheles roquensis* (Acari: Macrochelidae) alimentado com *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). En *Proceedings of the 15th Simpósio de Controle Biológico*, 4–8 de junho de 2017, Ribeirão Preto, Brazil.
- Sarkar, S., Dias, J., Gil, B., Keeley, J., Möhring, N., Jansen, K., 2021. The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food. Policy Department for External Relations, Directorate General for External Policies of the Union, European Parliament. <https://doi.org/doi/10.2861/953921>
- Saul, S.H., Tam, S.Y.T., McInnis, D.O., 1988. Relationship between sperm competition and copulation duration in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 81, 498–502. <https://doi.org/10.1093/aesa/81.3.498>
- Scolari, F., Gomulski, L.M., Gabrieli, P., Manni, M., Savini, G., Gasperi, G., Malacrida, A.R., 2014a. How functional genomics will impact fruit fly pest control: The example of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genet.* 15 Suppl 2, S11. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S11>
- Scolari, F., Gomulski, L.M., Ribeiro, J.M.C., Siciliano, P., Meraldi, A., Falchetto, M., Bonomi, A., Manni, M., Gabrieli, P., Malovini, A., Bellazzi, R., Aksoy, S., Gasperi,

- G., Malacrida, A.R., 2012. Transcriptional profiles of mating-responsive genes from testes and male accessory glands of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. PLoS One 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046812>
- Scolari, F., Yuval, B., Gomulski, L.M., Schetelig, M.F., Gabrieli, P., Bassetti, F., Wimmer, E.A., Malacrida, A.R., Gasperi, G., 2014b. Polyandry in the medfly - shifts in paternity mediated by sperm stratification and mixing. BMC Genet. 15 Suppl 2, S10. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S10>
- Seo, S.T., Vargas, R.I., Gilmore, J.E., Kurashima, R.S., And, I., Fujimoto, M.S., 1990. Sperm transfer in normal and gamma-irradiated, laboratory-reared Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 83 (5), 1949–1953. <https://doi.org/10.1093/jee/83.5.1949>
- Shadmany, J., Lee, S.F., Taylor, P.W., 2021. Real-time PCR-based Y-specific sperm quantification assay in Queensland fruit fly: Insights to patterns of sperm storage. Insect. Mol. Biol. 30, 315–324. <https://doi.org/10.1111/imb.12697>
- Sharma, A., Shukla, A., Attri, K., Kumar, M., Kumar, P., Suttee, A., Singh, G., Barnwal, R.P., Singla, N., 2020. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. Ecotoxicol. Environ. Saf. 201, e110812. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110812>
- Shaurub, E.S.H., Soliman, N.A., Sabbour, M.M., 2021. Development of the soil-inhabiting stages of *Ceratitis capitata* infected with entomopathogenic nematodes: insights on survival. Invertebr. Reprod. Dev. 65, 155–162. <https://doi.org/10.1080/07924259.2021.1920482>
- Shelly, T., Whittier, T., 1993. Effect of sexual experience on the mating success of males of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae). In *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society*. Vol 32, pp. 91–94
- Shelly, T.E., Edu, J., Pahio, E., 2011. Female Medflies mate selectively with young males but gain no apparent fitness benefits. J. Insect. Behav. 24, 55–66. <https://doi.org/10.1007/s10905-010-9236-6>
- Shelly, T.E., Kennelly, S., 2002. Influence of male diet on male mating success and longevity and female remating in the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. Fla. Entomol. 85, 572–579. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0572:IOMDOM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0572:IOMDOM]2.0.CO;2)

- Shelly, T.E., Steiner, E., Bosco, V., McInnis, D., 2006. Additional tests on the efficacy of ginger root oil in enhancing the mating competitiveness of sterile males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* 38, 41–47.
- Shelly, T.E., Whittier, T.S., 1996. Mating competitiveness of sterile male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in male-only releases. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89, 754–758. <https://doi.org/10.1093/aesa/89.5.754>
- Shoukry, A., Hafez, M., 1979. Studies on the biology of the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. Appl.* 26, 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1979.tb02894.x>
- Silva, A., Gonçalves, C.R., Galvão, D.M., Gonçalves, A.J.L., Gomes, J., Silva, M.N., Simoni, L., 1968. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores. Ministério da Agricultura 622.
- Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., Geissen, V., 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Sci. Total Environ.* 653, 1532–1545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>
- Simmons, L.W., 2019. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctvs32sr2>
- Simmons, L.W., Siva-Jothy, M.T., 1998. Sperm Competition in Insects: Mechanisms and the Potential. En Birkhead, T.R., Møller, A.P. (Eds.), *Sperm Competition and Sexual Selection*. Elsevier, pp. 341–432.
- Sivinski, J., Burk, T., 1989. Reproductive and mating behaviour. En Robinson, A.S., Hooper, G. (Eds.), *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control* Vol. 3A. Elsevier, pp. 343–351.
- Smith, P.H., Gillott, C., Barton Browne, L., Van Gerwen, A.C.M. 1, 1990. The mating induced refractoriness of *Lucilia cuprina* females: manipulating the male contribution. *Physiol. Entomol.* 15 (4), 469–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00536.x>
- Smith, R.H., Von Borstel, R.C., 1972. Genetic control of insect populations: A wide variety of documented genetic methods should be considered for

- regulation of pest populations. *Science* 178 (4066), 1164–1174. <https://doi.org/10.1126/science.178.4066.1164>
- Snow, L.S.E., Andrade, M.C.B., 2004. Pattern of sperm transfer in Redback spiders: Implications for sperm competition and male sacrifice. *Behav. Ecol.* 15, 785–792. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh080>
- Soliman, N.A., Ibrahim, A.A., Shams El-Deen, M.M., Ramadan, N.F., Farag, S.R., 2014. Entomopathogenic nematodes and fungi as biocontrol agents for the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders) and the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) soil borne-stages. *Egypt J. Biol. Pest Control* 24, 497–502.
- Spanos, L., Koutroumbas, G., Kotsyfakis, M., Louis, C., 2000. The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9, 139–144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00165.x>
- Spitler, G.H., Armstrong, J.W., Couey, H.M., 1984. Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Host Status of Commercial Lemon. *J. Econ. Entomol.* 77, 1441–1444. <https://doi.org/10.1093/jee/77.6.1441>
- StatPoint Technologies Inc, 2010. *Statgraphics*® Centurion XVI, Version 16.1.03. Warrenton, VA, USA.
- Stehle, S., Schulz, R., 2015. Agricultural insecticides threaten surface waters at the global scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (18), 5750–5755. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500232112>
- Steck, G.J., Carroll, L.E., Celedonio-Hurtado, H., Guillen-Aguilar, J., 1990. Methods for identification of *Anastrepha* larvae (Diptera: Tephritidae), and key to 13 species. *Proc. Entomol. Soc. Wash* 92: 333–346.
- Steck, G.J., Ekesi, S. 2015. Description of third instar larvae of *Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa* (FAR complex) and *C. capitata* (Diptera: Tephritidae), En De Meyer, M., Clarke, A. R., Vera T. M., Hendrichs J. (Eds.), *Resolution of cryptic species complexes of tephritid pests to enhance SIT application and facilitate international trade*. *ZooKeys* 540: 443–466. <https://10.3897/zookeys.540.10061>
- Stratec Molecular, 2015. Instruction for Invisorb® DNA CleanUp. Protocol 4: Purification of PCR products from PCR reaction mixes up to 50 –200µl.

- Stratec Molecular, 2016. User manual Invisorb Spin Plasmid Mini Two® for isolation of pDNA from 0.5 - 2.0 ml bacteria suspension. Protocol 1: Preparation of pDNA from 0,5 -2,0 ml bacteria cultures.
- Sturm, R., 2014. Comparison of sperm number, spermatophore size, and body size in four cricket species. *J. Orthoptera Res.* 23(1), 39-47. <https://doi.org/10.1665/034.023.0103>
- Suárez, L., Biancheri, M.J.B., Murúa, F., Bilbao, M., García, M., Cancino, J., Martín, O., Molina, D., Laría, O., Ovruski, S.M., 2019. Effects of host age and radiation dose in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) mass-reared on medfly larvae of the tsl Vienna 8 genetic sexing strain. *Biol. Control* 130, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.12.013>
- Sunnucks, P., Hales, D.F., 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. Evol.* 13 (3), 510-524. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025612>.
- Taylor, P.W., Kaspi, R., Mossinson, S., Yuval, B., 2001. Age-dependent insemination success of sterile Mediterranean fruit flies. *Entomol. Exp. Appl.* 98, 27-33. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00753.x>
- Taylor, P.W., Kaspi, R., Yuval, B., 2000. Copula duration and sperm storage in Mediterranean fruit flies from a wild population. *Physiol. Entomol.* 25, 94-99. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2000.00169.x>
- Taylor, P.W., Yuval, B., 1999. Postcopulatory sexual selection in Mediterranean fruit flies: Advantages for large and protein-fed males. *Anim. Behav.* 58, 247-254. <https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1137>
- Teruya, T., Nishida, K., Tao, M., Kuba, H., 1985. Cytological identification of testes from native and irradiated melon flies, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). *Okinawan Agriculture* 20, 30-37.
- Thornhill, R., Alcock, J., 1983. *The evolution of insect mating systems*. Cambridge, MA and London, England: Harvard University Press. <https://doi.org/doi:10.4159/harvard.9780674433960>

- Toledo, J., Campos, S.E., Flores, S., Liedo, P., Barrera, J.F., Villaseñor, A., Montoya, P., 2007. Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *J. Econ. Entomol.* 100, 291–297. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2007\)100\[291:HTOBBI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2007)100[291:HTOBBI]2.0.CO;2)
- Tooker, J.F., Pearsons, K.A., 2021. Newer characters, same story: neonicotinoid insecticides disrupt food webs through direct and indirect effects. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 46, 50–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.02.013>
- Tsubaki, Y., Yamagishi, M., 1991. “Longevity” of sperm within the female of the melon fly, *Dacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), and its relevance to sperm competition. *J. Insect. Behav.* 4, 243–250. <https://doi.org/10.1007/BF01054616>
- Twig, E., Yuval, B., 2005. Function of multiple sperm storage organs in female Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*, Diptera: Tephritidae). *J. Insect. Physiol.* 51, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.11.007>
- NCBI (The National Center for Biotechnology Information), 2017. Genome Data Viewer – *Ceratitis capitata* (NW_019378585.1: 1–11.11M). National Library of Medicine, United States of America. - [WWW Document] URL https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?acc=GCF_000347755.3&context=genome (Consulta: 24.09.18).
- Unión Europea, 2009a. Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 309, de 24.11.2009.
- Unión Europea, 2009b. Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 309, de 24.11.2009.
- Unión Europea, 2021. Council Decision (EU) 2021/1102 of 28 June 2021 requesting the Commission to submit a study on the Union’s situation and options regarding the introduction, evaluation, production, marketing and use of invertebrate biological control agents within the territory of the Union

- and a proposal, if appropriate in view of the outcomes of the study. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 238, de 06.07.2021.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm M., Rozen, S.G., 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Urbaneja, A., Marí, F.G., Tortosa, D., Navarro, C., Vanaclocha, P., Bargues, L., Castañera, P., 2006. Influence of ground predators on the survival of the Mediterranean fruit fly pupae, *Ceratitis capitata*, in Spanish citrus orchards. *BioControl* 51, 611–626. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-2938-6>
- Valdez, M.J., 2001. Ultrastructure of the testis of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94, 251–256. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2001\)094\[0251:UOTTOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2001)094[0251:UOTTOT]2.0.CO;2)
- Valdez-Carrasco, J., Prado-Beltran, E., 1990. Skeleton and musculature of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Folia. Entomol. Mex.* 80, 59–225.
- van Lenteren, J.C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W.J., Urbaneja, A., 2017. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63, 39–59. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Vayssières, J.F., Korie, S., Coulibaly, O., Melle, C. Van, Temple, L., Arinloye, D., 2009. The mango tree in central and Northern Benin: Damage caused by fruit flies (Diptera: Tephritidae) and computation of economic injury level. *Fruits* 64, 207–220. <https://doi.org/10.1051/fruits/2009016>
- Venter, J.H., Baard, C.W.L., Barnes, B.N., 2021. Area-wide management of Mediterranean fruit fly with the sterile insect technique in South Africa: New production and management techniques pay dividends. En Hendrichs, J., Pereira, R., Vreysen, M.J. (Eds.), *Area-Wide Integrated Pest Management. Development and Field Application*, CRC Press, pp. 129–141. <https://doi.org/10.1201/9781003169239>
- Vera, M.T., Cladera, J.L., Calcagno, G., Vilardi, J.C., McInnis, D.O., Stolar, E., Segura, D., Petit Marty, N., Krsticevic, F., Gomez Cendra, P., Rodriguez, M., Barborini, K., Heer, T., Allinghi, A., Bonpland, G., Hansen, L., Segade, G., 2003.

- Remating of wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) females in field cages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 96, 563–570. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2003\)096\[0563:ROWCCD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2003)096[0563:ROWCCD]2.0.CO;2)
- Vera, M.T., Rodriguez, R., Segura, D.F., Cladera, J.L., Sutherst, R.W., 2002a. Potential geographical distribution of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), with emphasis on Argentina and Australia. *Environ. Entomol.* 31, 1009–1022. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-31.6.1009>
- Vera, M.T., Wood, R.J., Cladera, J.L., Gilburn, A.S., 2002b. Factors affecting female remating frequency in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 85, 156–164. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0156:fafrfi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0156:fafrfi]2.0.co;2)
- Vijaysegaran, S., Walter, G.H., Drew, R.A.I., 1997. Mouthpart structure, feeding mechanisms, and natural food sources of adult *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 184–201. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.2.184>
- Vontas, J., Hernández-Crespo, P., Margaritopoulos, J. T., Ortego, F., Feng, H. T., Mathiopoulos, K.D., Hsu, J. C., 2011. Insecticide resistance in Tephritid flies. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 100 (3), 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.004>
- Vreysen, M.J., Robinson, A.S., Hendrichs, J., 2007. *Area-wide control of insect pests: From Research to field implementation.* Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Ward, P.I., 2000. Cryptic female choice in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (L.). *Evolution* (NY) 54, 1680–1686. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00712.x>
- Ward, P.I., 1993. Females influence sperm storage and use in the yellow dung fly *Scathophaga stercoraria* (L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 32, 313–319. <https://doi.org/10.1007/BF00183786>
- Wedell, N., Gage, M.J.G., Parker, G.A., 2006. Sperm competition, male prudence, and sperm-limited females (2002). En Shackelford, T.K., Pound, N. (Eds.), *Sperm competition in humans.* Springer, Boston, MA. pp. 47–63. https://doi.org/10.1007/978-0-387-28039-4_3

- Weems, H.V.J., 1981. The Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Washington, D.C, U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Entomology, n°160. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.63361>
- Weldon, C.W., Nyamukondiwa, C., Karsten, M., Chown, S.L., Terblanche, J.S., 2018. Geographic variation and plasticity in climate stress resistance among southern African populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Sci. Rep.* 8, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28259-3>
- Weldon, C.W., Prenter, J., Taylor, P.W., 2010. Activity patterns of Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*) are affected by both mass-rearing and sterilization. *Physiol. Entomol.* 35, 148-153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2010.00726.x>
- Weldon, C.W., Terblanche, J.S., Chown, S.L., 2011. Time-course for attainment and reversal of acclimation to constant temperature in two *Ceratitis* species. *J Therm. Biol.* 36, 479-485. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2011.08.005>
- White, I.M., Elson-Harris, M.M., 1992. Fruit Flies of Economic Significance: their Identification and Bionomics, CAB International, Wallingford, Oxon. CAB International. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/ee/22.6.1408>
- Whittier, T.S., Kaneshiro, K.Y., 1995. Intersexual selection in the Mediterranean fruit fly: Does female choice enhance fitness? *Evolution* (NY) 49 (5), 990-996. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1995.tb02333.x>
- Whittier, T.S., Kaneshiro, K.Y., Prescott, L.D., 1992. Mating behavior of Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in a natural environment. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85, 214-218. <https://doi.org/10.1093/aesa/85.2.214>
- Whittier, T.S., Nam, F.Y., Shelly, T.E., Kaneshiro, K.Y., 1994. Male courtship success and female discrimination in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Insect. Behav.* 7, 159-170. <https://doi.org/10.1007/BF01990078>
- Whittier, T.S., Shelly, T.E., 1993. Productivity of Singly vs. Multiply Mated Female Mediterranean Fruit Flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Bull. Ent. Soc. Amer.* 66, 200-209. <https://doi.org/10.1093/besa/14.1.14b>

- Wijnands, F., Garcia-Marí, F., Malavolta, C., Escudero-Colomar, L.A., Ferrer, M.T.M., 2016. Crop specific technical guidelines for integrated production of citrus, IOBC-WPRS, Commission IP Guidelines. <https://doi.org/10.1007/s004490050039>
- Willhoeft, U., Franz, G., 1996. Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144 (2), 737-745. <https://doi.org/10.1093/genetics/144.2.737>
- Williamson, D.L., 1989. Oogenesis and spermatogenesis. En Robinson, A.S., Hooper, G. (Eds.), *Fruit Flies. Their Biology, Natural Enemies and Control* Vol. 3A. Elsevier, pp. 141-151.
- Wong, T.T., Kobayashi, R.M., Whitehand, L.C., Henry, D.G., Zadig, D.A., Denny, A.L., EconEntomol, J., 1984. Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Mating choices of irradiated laboratory-reared and untreated wild flies of California in laboratory cages. *J. Econ. Entomol.* 77, 58-62. <https://doi.org/10.1093/jee/77.1.58>
- Wood, R.J., Harris, D.J. 1989. Artificial natural selection- En A.S. Robinson, A.S., Hopper G. (Eds.), *Fruit Flies: Their Biology Natural Enemies, and Control*, vol. 3B, Elsevier Science, Publishers, Amsterdam, pp. 19-31.
- Yamagishi, M., Tsubaki, Y., 1990. Copulation duration and sperm transfer in the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera, Tephritidae). *Appl. Entomol. Zool.* 25 (4), 517-519. <https://doi.org/10.1303/aez.25.517>
- Yousef, M., Garrido-Jurado, I., Quesada-Moraga, E., 2014. One *Metarhizium brunneum* strain, two uses to control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 107, 1736-1744. <https://doi.org/10.1603/EC14201>
- Yousef, M., Garrido-Jurado, I., Ruíz-Torres, M., Quesada-Moraga, E., 2017. Reduction of adult olive fruit fly populations by targeting preimaginals in the soil with the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum*. *J. Pest. Sci.* 90, 345-354. <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0779-y>
- Yuval, B., Blay, S., Kaspi, R., 1996. Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89 (3), 486-492. <https://doi.org/10.1093/aesa/89.3.486>

- Yuval, B., Hendrichs, J., 2000. Behavior of flies in the Genus *Ceratitis*. En M. Aluja, Norrbom, A. (Eds.), *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 429–457. <https://doi.org/10.1201/9781420074468>
- Yuval, B., Maor, M., Levy, K., Kaspi, R., Taylor, P., Shelly, T., 2007. Breakfast of champions or kiss of death? Survival and sexual performance of protein-fed, sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 90, 115–122. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2007\)90\[115:BOCOKO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2007)90[115:BOCOKO]2.0.CO;2)
- Zavala-López, J.L., Marte-Díaz, G., Martínez-Pujols, F., 2021. Successful area-wide eradication of the invading Mediterranean fruit fly in the Dominican Republic. En Hendrichs, J., Pereira, R., Vreysen, M.J. (Eds.), *Area-Wide Integrated Pest Management. Development and Field Application*, CRC Press, pp. 519–537. <https://doi.org/10.1201/9781003169239-15>
- Zhou, Q., Untalan, P.M., Haymer, D.S., 2000. Repetitive A – T rich DNA sequences from the Y chromosome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genome* 43(3), 434–438. <https://doi.org/10.1139/g99-133>. PMID: 10902705.
- Zumreoglu, A., Ohinata, K., Fujimoto, M., Higa, H., Harris, E.J., 1979. Gamma irradiation of the Mediterranean fruit fly: Effect of treatment of immature pupae in nitrogen on emergence, longevity, sterility, sexual competitiveness, mating ability, and pheromone production of males. *J. Econ. Entomol.* 72, 173–176. <https://doi.org/10.1093/jee/72.2.173>

Información complementaria



INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Capítulo 1 Introducción General. Tefrítidos europeos

Tabla S1 | Especies de tefrítidos presentes en Europa según registros en la base de datos Fauna Europaea- Global Biodiversity Information Facility. Resaltadas en negrita se indican las especies cuya presencia ha sido citada en España en la referenciada base de datos. (de Jong y col. 2014; GBIF.org 2024).

Subfamilia	Género	Especies
Dacinae	<i>Capparimyia</i>	C. savastani
	<i>Ceratitis</i>	C. capitata
	<i>Bactrocera</i>	B. oleae ; <i>B. dorsalis</i>
	<i>Myiopardalis</i>	<i>M. pardalina</i>
Trypetinae	<i>Euphranta</i>	<i>E. connexa</i> ; <i>E. toxoneura</i>
	<i>Carpomya</i>	C. incompleta ; C. schineri ; C. vesuviana
	<i>Rhagoletis</i>	<i>R. alternata</i> ; <i>R. batava</i> ; <i>R. berberidis</i> ; R. cerasi ; <i>R. cingulata</i> ; R. completa ; <i>R. flavicincta</i> ; R. meigenii ; R. zernyi
	<i>Goniglossum</i>	G. wiedemanni
	<i>Acidia</i>	<i>A. cognata</i>
	<i>Anomoia</i>	A. purmunda
	<i>Chetostoma</i>	<i>C. curvinerve</i> ; <i>C. stackelbergi</i>
	<i>Myoleja</i>	M. lucida
	<i>Nitrariomyia</i>	<i>N. lukjanovitshi</i>
	<i>Plioreocepta</i>	<i>P. poeciloptera</i>
<i>Anastrephoides</i>	<i>A. gerkei</i>	
<i>Cornutrypeta</i>	<i>C. spinifrons</i> ; <i>C. superciliata</i>	
<i>Cryptaciura</i>	<i>C. rotundiventris</i>	

Tabla S1 | Continuación.

Subfamilia	Género	Especies
Trypetinae	<i>Euleia</i>	E. heraclei ; <i>E. marmorea</i> ; E. separata
	<i>Hemilea</i>	H. dimidiata
	<i>Phylophylla</i>	P. caesio
	<i>Platyparea</i>	<i>P. carpathica</i> ; P. discoidea
	<i>Stemonocera</i>	<i>S. cornuta</i> ; <i>S. spinulosa</i>
	<i>Trypeta</i>	<i>T. artemisiae</i> ; <i>T. immaculata</i> ; <i>T. intermissa</i> ; T. zoe
	<i>Procecidochares</i>	P. utilis
	<i>Dithryca</i>	<i>D. guttularis</i> ; D. guttulosa
	<i>Euaresta</i>	E. bullans
	<i>Acinia</i>	<i>A. biflexa</i> ; <i>A. corniculata</i>
	<i>Merzomyia</i>	<i>M. westermanni</i>
<i>Paracarphotricha</i>	<i>P. alpestris</i>	
<i>Asimoneura</i>	<i>A. stroblii</i>	
<i>Eurasimona</i>	<i>E. stigma</i>	
<i>Inuromaesa</i>	<i>I. maura</i>	
Tephritinae	<i>Myopites</i>	M. apicatus ; <i>M. boghariensis</i> ; <i>M. bonifaciae</i> ; <i>M. cypricus</i> ; <i>M. eximia</i> ; M. inulaedyssentericae ; <i>M. lelea</i> ; M. longirostris ; M. nigrescens ; <i>M. olii</i> ; M. stylatus ; <i>M. tenellus</i> ; <i>M. zernyi</i>
	<i>Urophora</i>	<i>U. affinis</i> ; <i>U. aproca</i> ; <i>U. cardui</i> ; <i>U. christophi</i> ; <i>U. congrua</i> ; <i>U. coronata</i> ; <i>U. cuspidata</i> ; <i>U. dzieduszyckii</i> ; U. hispanica ; <i>U. impicta</i> ; <i>U. jaceana</i> ; <i>U. jaculata</i> ; <i>U. kasachtanica</i> ; <i>U. korneyevi</i> ; <i>U. longicauda</i> ; <i>U. lopholomae</i> ; U. mauritanica ; <i>U. neuenschwanderi</i> ; <i>U. pauperata</i> ; <i>U. phalolepidis</i> ; <i>U. pontica</i> ; U. quadrifasciata ; <i>U. sirunaseva</i> ; <i>U. sjumorum</i> ; <i>U. solstitialis</i> ; <i>U. spoliata</i> ; U. stylata ; <i>U. tenuis</i> ; U. terebrans ; <i>U. trinervii</i> ; <i>U. variabilis</i> ; <i>U. xanthippe</i>
	<i>Ensina</i>	<i>E. azorica</i> ; E. decisa ; E. sonchi
	<i>Hyphenidium</i>	H. graecum

Tabla S1 | Continuación.

Subfamilia	Género	Especies
Tephritinae	<i>Noeeta</i>	<i>N. bisetosa</i> ; <i>N. crepidis</i> ; <i>N. hemiradiata</i> ; <i>N. pupillata</i> ; <i>N. strigilata</i> ;
	<i>Paracanthella</i>	<i>P. pavonina</i>
	<i>Hendrella</i>	<i>H. winnertzi</i>
	<i>Oedaspis</i>	<i>O. dichotoma</i> ; <i>O. fissa</i> ; <i>O. multifasciata</i> ; <i>O. quinquefasciata</i> ; <i>O. ragdai</i> ; <i>O. sofiana</i>
	<i>Placaciura</i>	<i>P. alacris</i>
	<i>Ptiloedaspis</i>	<i>P. tavaresiana</i>
	<i>Acanthiophilus</i>	<i>A. helianthi</i> ; <i>A. walkeri</i>
	<i>Actinoptera</i>	<i>A. discoidea</i> ; <i>A. espunensis</i> ; <i>A. filaginis</i> ; <i>A. mamulae</i>
	<i>Campiglossa</i>	<i>C. absinthii</i> ; <i>C. achyrophora</i> ; <i>C. argyrocephala</i> ; <i>C. contingens</i> ; <i>C. difficilis</i> ; <i>C. doronici</i> ; <i>C. duplex</i> ; <i>C. freidbergi</i> ; <i>C. grandinata</i> ; <i>C. guttella</i> ; <i>C. irrorata</i> ; <i>C. loewiana</i> ; <i>C. malaris</i> ; <i>C. martii</i> ; <i>C. misella</i> ; <i>C. multimaculosa</i> ; <i>C. plantaginis</i> ; <i>C. producta</i> ; <i>C. punctella</i> ; <i>C. reticulata</i> ; <i>C. solidaginis</i>
	<i>Capitites</i>	<i>C. ramulosa</i>
	<i>Dioxyna</i>	<i>D. bidentis</i> ; <i>D. sororcula</i>
	<i>Euarestella</i>	<i>E. megacephala</i>
	<i>Goniurellia</i>	<i>G. longicauda</i> ; <i>G. persignata</i>
	<i>Heringina</i>	<i>H. guttata</i>
	<i>Oedosphenella</i>	<i>O. canariensis</i>
	<i>Orotava</i>	<i>O. cribata</i>
	<i>Oxyina</i>	<i>O. albipila</i> ; <i>O. flavipennis</i> ; <i>O. lutulenta</i> ; <i>O. nasuta</i> ; <i>O. nebulosa</i> ; <i>O. obesa</i> ; <i>O. parietina</i>
<i>Spathulina</i>	<i>S. sicula</i>	
<i>Sphenella</i>	<i>S. marginata</i>	

Tabla S1 | Continuación.

Subfamilia	Género	Especies
Tephritinae	Tephritis	<i>T. acanthiophilopsis</i> ; <i>T. angustipennis</i> ; T. arnicae ; T. bardanae ; <i>T. brachyura</i> ; <i>T. carmen</i> ; T. cometa ; <i>T. conura</i> ; <i>T. conyzifoliae</i> ; <i>T. crepidis</i> ; <i>T. dilacerata</i> ; <i>T. dioscurea</i> ; T. divisa ; <i>T. dudichi</i> ; T. fallax ; T. formosa ; <i>T. frauenfeldi</i> ; <i>T. heliophila</i> ; T. hendeliana ; <i>T. hungarica</i> ; <i>T. hurvitzii</i> ; T. hyoscyami ; <i>T. leontodontis</i> ; T. luteipes ; <i>T. maccus</i> ; T. mariannae ; <i>T. matricariae</i> ; <i>T. mutabilis</i> ; <i>T. neesii</i> ; T. nigricauda ; T. postica ; T. praecox ; T. pulchra ; T. recurrens ; <i>T. ruralis</i> ; <i>T. santolinae</i> ; <i>T. sauterina</i> ; <i>T. scorzonerae</i> ; <i>T. separata</i> ; T. simplex ; T. stictica ; <i>T. tanaceti</i> ; <i>T. truncata</i> ; <i>T. valida</i> ; T. vespertina ; T. zernyi
	Tephritomyia	<i>T. lauta</i>
	Trupanea	T. amonea ; <i>T. cosmia</i> ; <i>T. guimari</i> ; T. insularum ; T. stellata ; <i>T. tubulata</i>
	Chaetorellia	C. acrolophi ; <i>C. australis</i> ; <i>C. carthami</i> ; <i>C. conjuncta</i> ; C. hestia ; <i>C. isais</i> ; C. jaceae ; <i>C. loricata</i> ; <i>C. succinea</i>
	Chaetostomella	C. baezi ; C. cylindrica ; <i>C. rossica</i> ; <i>C. steropea</i> ; <i>C. zhuravlevi</i>
	Orellia	O. falcata ; <i>O. scorzonerae</i> ; O. stictica
	Terellia	<i>T. ceratocera</i> ; <i>T. ciarissima</i> ; <i>T. euura</i> ; <i>T. lappae</i> ; <i>T. nigronota</i> ; <i>T. plagiata</i> ; <i>T. rhapsodic</i> ; <i>T. setifera</i> ; T. tussilaginis ; <i>T. colon</i> ; <i>T. fuscicornis</i> ; T. longicauda ; <i>T. luteola</i> ; <i>T. odontolophi</i> ; <i>T. orheana</i> ; <i>T. pseudovirens</i> ; <i>T. ruficauda</i> ; <i>T. sabroskyi</i> ; T. serratulae ; <i>T. uncinata</i> ; T. vectensis ; T. virens ; <i>T. winthemi</i> ; <i>T. zerovae</i>
	Ictericodes	<i>I. japonicus</i> ; <i>I. zelleri</i>
	Xyphosia	<i>X. laticuada</i> ; X. miliaria

Resumen



RESUMEN

La familia Tephritidae constituye un grupo de dípteros de gran interés económico debido a que incluye especies consideradas plagas en casi todas las áreas frutícolas del mundo, especialmente las conocidas como moscas de la fruta. Sus larvas se desarrollan en el interior de frutos blandos, lo que ocasiona considerables pérdidas económicas. Estas pérdidas provienen tanto de los daños directos que causan a los frutos, dificultando su comercialización local, como de las pérdidas en los mercados de exportación. Las especies de la familia Tephritidae son consideradas cuarentenarias y están sujetas a estrictas regulaciones en las zonas designadas como libres de ellas.

Entre las especies de tefrítidos citadas en España, se encuentra *Ceratitis capitata*, la mosca de la fruta del Mediterráneo, plaga de gran relevancia económica en el país. De hecho, la prevención y lucha contra *C. capitata* se califican de utilidad pública en España y su gestión es obligatoria en las comunidades autónomas donde está declarada como plaga. Su peligrosidad se debe tanto a la capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales de cada uno de sus estadios de desarrollo, como a su polifagia, ya que presenta el mayor rango de hospederos conocido entre los tefrítidos. En regiones como la Comunidad Valenciana, con inviernos suaves, está presente en el campo durante todo el año y muestra, además, un solapamiento entre generaciones. Estas características hacen que la gestión de esta plaga requiera de actuaciones en grandes áreas frutícolas y con integración de diversas tecnologías y herramientas de control, siendo las actuaciones principales los tratamientos químicos, el trampeo masivo y la aplicación de la técnica del insecto estéril (TIE).

Conocer la biología reproductiva de *C. capitata* es de gran importancia para desplegar nuevos métodos de control y mejorar los ya existentes, especialmente la TIE. Por ello, se ha desarrollado esta tesis, para contribuir a la mejora de dicho conocimiento, centrándose particularmente en aspectos relacionados con la transferencia de esperma durante la cópula y su almacenamiento posterior en las espermatecas, que son los principales órganos de almacenamiento de esperma en las hembras de *C. capitata*.

En esta línea, y haciendo uso de los avances biotecnológicos, en primer lugar (capítulo 2) se desarrolló un método molecular de cuantificación, basado en la aplicación de una PCR en tiempo real mediante el uso de marcadores del cromosoma Y, para estimar la cantidad de espermatozoides contenidos en las espermatecas. Este método fue validado satisfactoriamente como medio de cuantificación de la cantidad de esperma almacenado en las espermatecas después del apareamiento para dos cepas de *C. capitata*, la cepa silvestre y la cepa Vienna-8, empleada internacionalmente en la producción masiva de machos estériles para el programa TIE. Además, los resultados obtenidos mostraron detecciones positivas de esperma en apareamientos de corta duración (10 minutos) y se confirmó la transferencia efectiva de esperma en el 78 % de los casos evaluados.

Una vez obtenido un método más eficaz para cuantificar el esperma almacenado en las espermatecas, éste se empleó para estudiar (Capítulo 3) la influencia de la edad del macho y la duración de la cópula en la cantidad de esperma transferido durante la misma, en ambas cepas. Estos aspectos que se han relacionado con el rendimiento de los machos estériles empleados en los programas TIE. Además de observarse un efecto de la cepa, se determinó una influencia positiva de la duración de la cópula en la cantidad de esperma recibido por las hembras. Los resultados mostraron un patrón gradual de transferencia no lineal que aumenta con la duración del apareamiento en ambas cepas. En cuanto a la edad de los machos no se observó una influencia en la cantidad de esperma transferido dentro del rango de edad evaluado.

Por último, se estudió la capacidad de los machos Vienna-8 estériles para volver a aparearse e inseminar a las hembras (Capítulo 4). El fenómeno del apareamiento múltiple, relacionado con la eficacia reproductiva de *C. capitata*, ha sido observado en las poblaciones naturales, tanto en hembras (poliandria) como en machos (poliginia), pero ha sido poco estudiada en machos irradiados. Los resultados mostraron que el 57 % de los machos estériles recopularon hasta en tres ocasiones y el 73 % al menos en una ocasión y que en estos reapareamientos hubo transferencia efectiva de esperma en el 99 % de los casos. En cuanto a la cantidad de espermatozoides transferidos en las recópulas producidas, se observó una tendencia a disminuir respecto a la primera cópula, pero no se detectó una situación de aspermia.

En conclusión, esta tesis desarrolla un nuevo método molecular basado en la detección del cromosoma Y para evaluar el esperma almacenado en las espermatecas de hembras en *C. capitata*. Este método ha sido validado para estimar los espermatozoides de las cepas silvestre y Vienna-8 de esta especie, y podría servir como modelo base para la cuantificación de gametos en otras especies de tefrítidos. Además, gracias a la fiabilidad y especificidad de este método, se ha podido determinar el grado de inseminación de las cópulas de *C. capitata*, incluso en apareamientos de corta duración. Se han mejorado los patrones de transferencia del esperma con relación al tiempo de apareamiento para ambas cepas, y se ha determinado, por primera vez, el potencial de recópula de los machos estériles Vienna-8 y su capacidad para transferir esperma no viable a lo largo de múltiples apareamientos. Estos resultados deben ser considerados en futuras investigaciones dentro del marco de los programas TIE.

RESUM

La família Tephritidae constituïx un grup de dípters de gran interès econòmic pel fet que inclou espècies considerades plagues en quasi totes les explotacions frutícoles del món, especialment les conegudes com a mosques de la fruita. Les seues larves es desenvolupen a l'interior de fruits carnosos, la qual cosa ocasiona considerables pèrdues econòmiques. Estes pèrdues provenen tant dels danys directes que causen als fruits, dificultant la seua comercialització local, com de les pèrdues en els mercats d'exportació. Les espècies de la família Tephritidae són considerades quarantenàries i estan subjectes a estrictes regulacions en les zones designades com a lliures d'estos organismes.

Entre les espècies de tefrítids citades a Espanya, es troba *Ceratitis capitata*, la mosca de la fruita del Mediterrani, plaga de gran rellevància econòmica al país. De fet, la prevenció i lluita contra *C. capitata* es qualifica d'utilitat pública a Espanya i la seua gestió és obligatòria en les comunitats autònomes on està declarada com a plaga. La seua perillositat es deu tant a la capacitat d'adaptació a diferents condicions ambientals de cadascun dels seus estadis de desenvolupament, com la seua polifàgia, ja que presenta el major rang de espècies hoste conegut entre els tefrítids. En regions com la Comunitat Valenciana, amb hiverns suaus, és present en camp durant tot l'any i mostra, a més, un solapament entre generacions. Estes característiques fan que la gestió d'aquesta plaga requerisca d'actuacions en grans àrees frutícoles i amb integració de diverses tecnologies i ferramentes de control, sent les actuacions principals els tractaments químics, el trampeig massiu i l'aplicació de la tècnica de l'insecte estèril (TIE).

Conèixer la biologia reproductiva de *C. capitata* és de gran importància per a desplegar nous mètodes de control i millorar els ja existents, especialment la TIE. Per això, s'ha desenvolupat esta tesi, per a contribuir a la millora d'este coneixement, centrant-nos particularment en aspectes relacionats amb la transferència d'esperma durant la còpula i el seu emmagatzematge posterior en les espermateques, que són els principals òrgans d'emmagatzematge d'esperma en les femelles de *C. capitata*.

En este sentit, i fent ús dels avanços biotecnològics, en primer lloc (capítol 2) es va desenvolupar un mètode molecular de quantificació, basat en l'aplicació d'una PCR en temps real mitjançant l'ús de marcadors del cromosoma Y, per a estimar la quantitat d'espermatozoides continguts en les espermateques. Este mètode va ser validat satisfactòriament com a mitjà de quantificació dels espermatozoides emmagatzemats en les espermateques després de l'aparellament per a dos soques de *C. capitata*, la soca silvestre i la soca Vienna-8, empleada internacionalment en la producció massiva de mascles estèrils per al programa TIE. A més, els resultats obtinguts van mostrar deteccions positives d'esperma en aparellaments de curta duració (10 minuts) i es va confirmar la transferència efectiva d'esperma en el 78% dels casos avaluats.

Una vegada obtingut un mètode més eficaç per a quantificar l'esperma emmagatzemat en les espermateques, aquest es va emprar per a estudiar (capítol 3) la influència de l'edat del mascle i la duració de la còpula en la quantitat d'esperma transferit durant esta, en ambdues soques. Estos aspectes s'han relacionat amb el rendiment dels mascles estèrils empleats en els programes TIE. A més d'observar-se un efecte de la soca, es va determinar una influència positiva de la durada de l'acoblament en la quantitat d'esperma rebut per les femelles. Els resultats van mostrar un patró gradual de transferència no lineal que augmenta amb la duració de l'aparellament en ambdues soques. Quant a l'edat dels mascles, no es va observar una influència en la quantitat d'esperma transferit dins del rang d'edat avaluat.

Finalment, es va estudiar la capacitat dels mascles Vienna-8 estèrils per a tornar a emparellar-se i inseminar a les femelles (capítol 4). El fenomen de l'aparellament múltiple, relacionat amb l'eficàcia reproductiva de *C. capitata*, ha sigut observat en les poblacions naturals, tant en femelles (poliàndria) com en mascles (poligínia), però ha sigut poc estudiada en mascles irradiats. Els resultats van mostrar que el 57% dels mascles estèrils van recopular fins a tres ocasions i el 73% almenys en una ocasió i que en estos reaparellaments va haver-hi transferència efectiva d'esperma en el 99% dels casos. Quant a la quantitat d'espermatozoides transferits en les récopulas produïdes, es va observar una tendència a disminuir respecte a la primera còpula, però no es va detectar una situació d'aspèrma.

En conclusió, esta tesi desenvolupa un nou mètode molecular basat en la detecció del cromosoma Y per a avaluar l'esperma emmagatzemat en les espermateques de femelles en *C. capitata*. Este mètode ha sigut validat per a estimar els espermatozoides de les soques silvestre i Vienna-8 d'esta espècie, i podria servir com a model base per a la quantificació de gàmetes en altres espècies de tefrítids. A més, gràcies a la fiabilitat i especificitat d'este mètode, s'ha pogut determinar el grau d'inseminació de les còpules de *C. capitata*, fins i tot en aparellaments de curta duració. S'han millorat els patrons de transferència de l'esperma en relació amb el temps d'aparellament per ambdues coques, i s'ha determinat, per primera vegada, el potencial de recòpula dels mascles estèrils Vienna-8 i la seua capacitat per a transferir esperma no viable al llarg de múltiples aparellaments. Estos resultats han de ser considerats en futures investigacions dins del marc dels programes TIE.

SUMMARY

Tephritidae family constitutes a great interest group of dipterans as it includes species considered pests in almost all fruit-growing areas around the world, especially those known as fruit flies. The larvae of these species develop inside soft fruits and cause significant economic losses. This detriment comes from the direct damages caused to the fruits, hindering their local marketing, and resulting in losses in export markets. Fruit flies of Tephritidae family are considered quarantine species and are subjected to strict regulations in those pest-free areas.

The Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, is among the recorded tephritids species in Spain and it is recognized as a pest of great economic importance by Spanish government, being its prevention and management mandatory in the communities where it is declared as a pest. The ability to adapt to different environmental conditions of each of its development stages and its polyphagy are two of the key aspects to become such a harmful pest. *C. capitata* has the largest host range known among tephritids. In regions with mild winters such as Comunidad Valenciana, located in the eastern coast of Spain, its populations are present in field throughout the whole year, even overlapping generations. These biological and adaptive traits make management of this pest require actions in large fruit-growing areas and the integration of various technologies and control tools. The integrated pest management programme includes chemical treatments, mass trapping and the application of the sterile insect technique (SIT).

The study of the reproductive biology of *C. capitata* is relevant for deploying new control methods and improving existing ones, especially SIT. Therefore, this thesis has been developed to contribute to the improvement of this knowledge, focusing particularly on aspects related to the transfer of sperm during copulation and its subsequent storage in the spermathecae, which are the main sperm storage organs in the *C. capitata* females.

Taking it into consideration, and making use of biotechnological advances, in chapter 2, we develop a molecular quantification method, based on the application of real-time PCR using Y-chromosome markers, to estimate the amount of sperm contained in spermathecae. This method was successfully validated to quantify the amount of spermatozoa stored in the spermathecae after mating for two strains of *C. capitata*, wild-type strain and Vienna-8 strain, used internationally in the mass production of sterile males in TIE programmes. Positive sperm detections were obtained in short-term matings (10 minutes) and effective sperm transfer was confirmed in 78% of the cases evaluated.

Once obtained this effective method to quantify the sperm stored in the spermathecae, it was used to study in chapter 3 the influence of male age and copula duration on the amount of sperm transferred during mating in both strains. These aspects have been related to the performance of sterile males used in TIE programmes. In addition to observing a strain effect, it was determined a positive influence of copula duration on the amount of sperm received by females. The results showed a gradual pattern of non-linear transfer that increases with mating duration in both strains. Regarding the age of the males, no influence was observed on the amount of sperm transferred within the evaluated age range.

Finally, the ability of sterile Vienna-8 males to remate and inseminate females was studied in chapter 4. The phenomenon of multiple mating, related to the reproductive efficiency of *C. capitata*, has been observed in natural

populations, both in females (polyandry) and males (polygyny), but it has been barely studied in irradiated males. The results of this chapter showed that 57% of the sterile males recopulated up to three times and 73% at least once, and there was effective sperm transfer in 99% of these rematings. Regarding the amount of sperm transferred along the remating occasions, a tendency to decrease was observed with respect to the first copulation, but a situation of aspermia was not detected.

In conclusion, this thesis develops a new molecular method based on the detection of the Y-chromosome to estimate the sperm stored in the spermathecae of females in *C. capitata*. This method has been validated to estimate spermatozoa from wild-type and Vienna-8 strains of this tephritid and it could be used as a model for the quantification of gametes in other fruit fly species. Furthermore, thanks to the reliability and specificity of this method, it has been possible to determine the degree of insemination of *C. capitata* copulations, even in short-term matings. Sperm transfer patterns have been improved in relation to mating time for both strains, and the remating potential of sterile Vienna-8 males and their ability to transfer non-viable sperm over multiple matings have been determined for the first time in a period of their lifetime. These results should be considered in future research within the framework of TIE programs.

Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS

La investigación desarrollada en esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación de la **Conselleria de Agricultura, Ganadería y Pesca** (Valencia, España) y a una beca de iniciación a la investigación que me fue concedida y subvencionada por el fondo cofinanciado por **Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)-Fondo Social Europeo** (2014, núm. 18 “Control Integrado de Plagas de Cítricos”).

Agradecer al **IVIA** las facilidades ofrecidas para desarrollar los experimentos de esta tesis doctoral en sus instalaciones, al personal técnico y de apoyo del IVIA por su ayuda indispensable, así como al personal de la empresa **TRAGSA** (Empresa de Transformación Agraria, S.A., S.M.E., M.P.) de la Bioplanta de Insectos Estériles y Centro de Empaque y Liberación de la Generalitat Valenciana por su asistencia técnica y suministro de material.

A mis directoras y director de tesis, Dra. **Meritxell Pérez**, Dra. **Elena Llácer** y Dr. **Alberto Urbaneja**, por vuestra cálida acogida al llegar al IVIA, por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral con vosotros, por vuestro tiempo y comprensión. Este trabajo doctoral ha tenido un recorrido poco habitual, con algunas curvas, y más largo de lo esperado, pero como no podía ser de otra manera, se ha concluido con vuestro apoyo. Gracias por animarme a seguir adelante durante estos años.

A mi profesora y tutora la Dra. **Eugenia Rodrigo** de la Universidad Politécnica de Valencia, por descubrirme el mundo de la entomología y ofrecerme esas primeras becas, gracias a las cuales fue labrándose mi porvenir. Siempre te estaré agradecida.

A mis compañeras de la **Universidad Politécnica de Valencia** de la **Escuela Politécnica Superior de Gandía Ester, Irene y Pepa**, y de la **Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos** de Valencia **Lucia e Isa**. A mis compañeras de **Máster Berta, Susana y Sujenith M.** Todas vosotras habéis formado parte de mi vida universitaria, una etapa muy bonita en la que compartimos intensas jornadas de estudio, y como no, muchos momentos divertidos, todos ellos recuerdos imborrables.

A los estudiantes en prácticas, auxiliares, técnicos e investigadores que he tenido la oportunidad de conocer durante los siete años que he estado en el IVIA, y de los que atesoro un gran recuerdo. Agradecer la ayuda y los consejos de **Antonio Olmos, Ana Ruiz y Félix Morant** de la Unidad de Bacteriología en el segundo capítulo de la tesis.

A todos mis **compañer@s de la Unidad de Entomología**, compartir a vuestro lado el día a día ha sido un placer, no se puede tener un equipo más divertido y trabajador, un sentir que aprecio más aún ahora en la distancia. La investigación es vocacional, y todos vosotros sois prueba de ello. A **Paco, César, Alejandro, José, y Miquel**, por vuestra cercanía y disposición para compartir vuestra experiencia, siempre he valorado mucho vuestros consejos y compañía. Siempre os tendré en muy alta estima. A mis compañeros **Omar y Carolina** del laboratorio de molecular, gracias a vuestra destreza y saber hacer, aprendí mucho a vuestro lado en el laboratorio. A **Carlos**, por todas esas risas que hemos compartido durante tantos almuerzos y demás eventos gastronómicos. A mis compañer@s de doctorado **Marian, Luis, Ruth, Angeliki, Milena, Sarra, Jesi, Alice, Chaymaa, Miguel, Angelos, Ángel**, me siento afortunada de haber coincidido con vosotros y de recorrer juntos esta etapa a la que hemos dedicado tanto esfuerzo, una vivencia que se queda para siempre. Han sido intensos días de laboratorio, de oficina o de campo, pero también muchos almuerzos, comidas, cenas y congresos muy divertidos, eso lo compensa todo. Os deseo todo lo mejor. Marian, Jesi, Ruth estos últimos años habéis sido mi apoyo incondicional, mis ejemplos a seguir. Hemos tomado rumbos profesionales distintos, pero estoy

segura, de haber seguido juntas, hubiéramos hecho un gran equipo. Aunque nunca se sabe si se cruzarán de nuevo nuestros caminos entomológicos, nos queda nuestra amistad.

A los **compañer@s de TRAGSA de la Bioplanta Nacho, Jaime, Miguel Ángel, Carles, Mamen, Marta, Sergio**, por ser tan cercanos y ofrecerme vuestra ayuda siempre que la he necesitado. A **Óscar, Fanny, Julieta, Esperanza, Ana, María, Tamara, Miriam y Azu** del equipo de I+D, del cual formé parte los últimos años mientras terminaba la tesis. Trabajar con vosotras ha sido una experiencia que me ha hecho aprender y crecer mucho a nivel personal y profesional, y aunque los inicios fueron duros, me siento muy feliz de haber sido parte del equipo. Ahora recuerdo con nostalgia esas reuniones semanales en el laboratorio, los torbellinos de ideas que surgían, los inventos varios o las historias que siempre teníais para contar y con las que nos echábamos unas buenas risas. Me llevo un bonito recuerdo de cada un@ de vosotr@s. A **Salva y Luís**, de la Universidad de Valencia, por los trabajos de colaboración que han surgido entre la UV, el IVIA y TRAGSA, ha sido un placer trabajar junto a vosotros.

A mis compañer@s de la Dirección General del Medio Natural y Animal en la Generalitat Valenciana, en especial a **Pep, María A., Joaquín, Ester y María S.**, con los que he compartido la fase final de esta tesis doctoral. Gracias por animarme a seguir adelante, y por vuestra ayuda y consejos en esta nueva etapa.

A mis amigos **Irene y Hugo** que, aunque estáis un poquito lejos, cuando venís al pueblo disfrutamos mucho de vuestra compañía. El mar nos une. A **Quique, Joan, Andrés, Rosamari, Bea, Miriam y Sandra** con los que he compartido tanto a lo largo de mi vida. Gracias por estar ahí. Chicas, nos queda pendiente una celebración, por todos esos planes aplazados.

A **José, Vero y Marina**, con la que comparto la pasión por los animalitos, (especialmente los de más de cuatro patas). Estoy segura de que serás una gran científica. Gracias familia, por todos esos buenos momentos que hemos compartido y que continuaremos disfrutando juntos.

A mi hermana **Paula**, mi cuñado **Salva** y mis sobrinos **Maria** y **Arnau**, los bichos que han revolucionado la familia, sois pura energía y creatividad, vuestros bailes, dibujos e inventos llenan de color fluorescente nuestras vidas. Me siento muy feliz a vuestro lado. Paula, gracias por sacar tiempo de donde no había y ayudarme con las portadas y las figuras de la tesis, y también a Maria, que ha supervisado los colorines, sois unas artistas. Por tenernos siempre la una a la otra.

A mis padres, **Pepe** y **Tere**, por su sacrificio y esfuerzo para que sus hijas tuvieran la oportunidad de llegar hasta donde se propusieran. Por tener vuestro apoyo en los momentos más complicados de mi vida y ayudarme hasta donde habéis podido. Os quiero mucho.

A **Juan**, por elegir compartir tu vida conmigo, por esforzarte en comprender, y apoyarme en las decisiones tomadas durante todos estos años y que han marcado el rumbo de nuestras vidas. Por nuestro cariño mutuo que nos ha hecho llegar donde estamos hoy y por todo lo que nos queda por recorrer juntos.

En aquesta tesi doctoral hi ha un poquet de tots vosaltres...

Amb estima,

Marta

