

Pruebas de comportamiento de *Ceratitis capitata* Wied. con sex-ceratitidis, producto nacional atrayente sexual de machos*

P. GARCÍA BENAVIDES, J. SERRANO VILAR y J. GARCÍA BENAVIDES

En el presente trabajo se efectúa la valoración de la eficacia en la atracción de machos de *Ceratitis capitata* Wied. del nuevo producto sex-ceratitidis. Para ello, mediante la técnica de olfactometría y utilizando parámetros principales: actividad de vuelo y anemotaxis o acercamiento a la fuente del atrayente se comparan dosis equivalentes de sex-ceratitidis y de trimedlure comercial. De los resultados obtenidos se deduce que el nuevo producto consigue la misma eficacia de acción con concentraciones reducidas a la tercera parte.

GARCÍA BENAVIDES, P., SERRANO VILAR, J. y GARCÍA BENAVIDES, J. *Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica*, Centro de Aldearrubia (Salamanca).

INTRODUCCION

El convenio de colaboración suscrito entre el Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica y la Cátedra de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, tiene como objeto la síntesis de diversos atrayentes sexuales de insectos entre los que figura en primer lugar *Ceratitis capitata* Wied. Como resultado de los trabajos realizados hasta el momento se ha patentado el proceso de obtención y la marca Sex-Ceratitidis.

La posición axial del Cl, a diferencia del Cl-ecuatorial, en la molécula del 4 (5) cloro-2-metil-ciclohexan-carboxilato de t-butilo es determinante de la atracción de los machos de la mosca mediterránea de las frutas, por lo que el nuevo proceso de síntesis que consigue un contenido superior al 90 por 100 son Cl-axial debe proporcionar un producto final más activo.

El fin del presente trabajo es la valoración de la eficacia del nuevo producto para lo cual, ha sido necesario conocer la etología sexual de *Ceratitis capitata* Wied., y poner a punto una serie de técnicas de olfactometría que son la base de la valoración de la eficacia.

* Trabajo presentado al Premio «Jorge Pastor 1982».



Fig. 1.—Macho de *Ceratitis capitata* Wied., en el que se observen las paletas orbitales características del sexo.

Fig. 2.—Hembra de *Ceratitis capitata* Wied., en cuyo extremo abdominal aparece el oviscapto.





Fig. 3.—Evolucionario de eclosión y cajas de mantenimiento de sexo separado.

Fig. 4.—Caja de mantenimiento de machos.



La respuesta de los dípteros a diferentes estímulos han sido estudiados por numerosos autores. En concreto la respuesta de la mosca de la fruta a estímulos olorosos fue estudiada en alguna forma de olfactómetro con el aire quieto por (JACOBSON y otros 1973; OHINATA y otros 1973; KOBAYASHI y otros 1978) y con el aire en movimiento por (NATION 1972; CIANNAKAKIS y FLETCHER 1978). Finalmente (JONES, LOMER y HOWSE, 1981), han estudiado la respuesta al olor uniformemente dispersado en el aire en un túnel de viento.

MATERIAL Y METODOS

Constitución del olfactómetro

El túnel de viento está constituido por un tubo cilíndrico de vidrio pirex de 1 m. de

longitud y 12 cm. de diámetro. En la parte anterior lleva acoplado un capuchón de 30 centímetros de longitud de los que los 20 primeros centímetros tienen forma cónica. A 30 cm. del extremo anterior y en el extremo posterior se colocan dos estructuras en panel de abeja de 4 cm. de espesor y una luz de malla de 4,5×3 mm. A diez centímetros del extremo posterior un orificio de 2 cm. de diámetro nos facilita la introducción de las moscas en el tubo cuando esté en funcionamiento.

Las dimensiones del tubo están pensadas para que de acuerdo con el número de Reynolds nos de un régimen laminar.

Las estructuras en panel de abeja tienen diferentes misiones por una parte, nos dividen el túnel en tres partes que llamaremos cámara de mezcla, cámara de vuelo y escape.

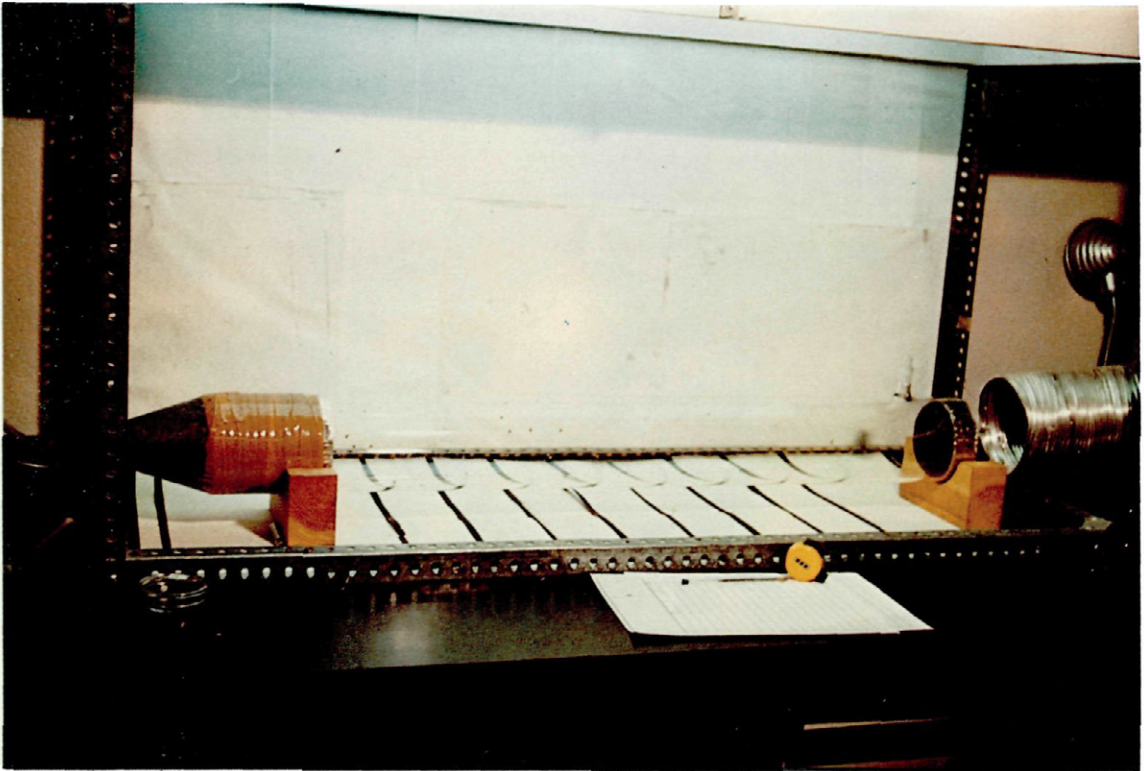


Fig. 5.—Aspecto general del olfactómetro.

Por otra parte, sirven para sujetar a los insectos en la cámara de vuelo y evitar que se pasen a las otras cámaras. Y, por último, y como misión más importante nos proporcionan un régimen laminar dentro de la cámara de vuelo y evitar el paso de perturbaciones tanto, viento arriba como viento abajo.

El aire es suministrado por una botella de aire comprimido, la cual lleva acoplado un manorreductor con su correspondiente manómetro y tornillo de presión que nos permite graduar el caudal y, por lo tanto, la velocidad del aire. Encima del túnel un armazón soporta cuatro tubos de luz día de arranque rápido con un potenciómetro de salida que nos permite mantener la intensidad lumínica en 2.250 lux, dentro del tubo durante la realización de los ensayos.

A modo de tierra y con objeto de que las moscas tengan un punto de referencia para poder volar, debajo del túnel se colocan bandas negras de papel a 10 cm. de distancia sobre un fondo blanco. Esto nos divide la cámara de vuelo en nueve zonas que tienen su utilidad en la realización de los ensayos.

Material biológico

Las moscas nos las suministró, en estado de pupa, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias de su Biofábrica del Encin. En el primer día de su emergencia separá-bamos por aspiración los machos y en sala climática a 11°C, pues se mantienen inmóviles, y los manteníamos en evolucionarios independientes en una cámara diferente a la de los ensayos en las siguientes condiciones: Fotoperíodo 15/9, Humedad relativa 50±5 por 100. Temperatura 25°±1 e Intensidad lumínica 2.250 lux.

Productos utilizados

Se emplearon las dosis de Sex-Ceratitís (4 (5) cloro-2-metil-Ciclohexan-Carboxilato de

t. butilo) y de Trimedlure comercial expresados en microgramos (µg.) con las siglas que se reseñan en el siguiente cuadro:

	Dosis µg.				
Productos	1	10	30	100	300
Sex-Ceratitís	SC 1	SC 10	SC 30	SC 100	SC 300
Trimedlure	—	TR 10	TR 30	TR 100	—

Metodología de los ensayos

La respuesta de los insectos en general a un estímulo de tipo sexual está condicionada por innumerables factores de tipo físico, químico y biológico, es por ello, que se hace necesario estandarizar los ensayos de forma que sean constantes aquellos factores en la medida de lo posible y que las únicas variables sean el tipo de producto y sus dosis con lo cual, estaremos en condiciones de concluir que las variaciones en la respuesta se deben exclusivamente a las variaciones de productos y dosis.

Factores biológicos.—La actividad sexual de las moscas se manifiestan durante la foto-fase y desde el comienzo de la misma, existiendo una relación inversa entre la duración de la fase oscura y la duración de la actividad sexual (CAUSE y FERÓN 1967).

Para el fotoperíodo utilizado en nuestro caso de 9 horas de fase oscura y 15 de fase luminosa se fijó la 6.ª hora como comienzo de los ensayos. Asimismo, se fijó en 30 el número de machos de 5 a 10 días de edad. Quince minutos antes de la hora de comienzo de cada ensayo se introducen los machos en el olfactómetro a fin de que se habitúen al nuevo recinto, empleando ese tiempo en movimientos de limpieza y toilette.

Factores físicos.—Durante los ensayos se mantuvieron constantes: la temperatura a 25°C±1, la humedad relativa a 50 por 100 ± 5 y la iluminación a 2.250 lux. Se trabajó con aire en régimen laminar con una volo-

cidad de 0,05 a 0,1 m.ség.⁻¹ medida con anemómetro de hilo caliente. La distribución del olor dentro del tubo se simuló con la técnica H Cl violeta de cristal.

Factores químicos.—Los productos en ensayo se presentaron a las dosis reseñadas anteriormente en dilución en hexano en un soporte de celulosa de 8 mm. de diámetro y espesores proporcionales a la dosis utilizadas. Debido a que los productos impregnan el vidrio, se procede después de cada ensayo a la descontaminación del olfactómetro mediante su desmantelamiento total lavándose todas y cada una de sus partes consecutivamente con detergente comercial, «Mucalol» y finalmente, con hexano.

Parámetros elegidos

La capacidad de respuesta de los machos de *Ceratitis capitata* Wied., la medimos mediante dos parámetros:

a) **Activación:** que se define como el número de vuelos por mosca y período de cinco minutos, midiéndose con contador digital.

b) **R-75:** la colonización del tubo por parte de los machos y su avance hacia el estímulo contra la corriente de aire (*anemotaxis* positiva. KENNEDY 1977) se expresa como el porcentaje de la longitud del tubo que contiene el 75 por 100 de los machos tomándose como origen la parte posterior del tubo. Para ello, al final de cada período de 5 minutos se anota el número de insectos situados en ese momento en cada una de las nueve bandas en que está dividido el olfactómetro.

Ensayos previos.—La duración de cada ensayo, los momentos característicos en la respuesta de los machos, así como las dosis a utilizar se determinaron mediante unos ensayos previos. En ellos se comprobó que dosis de 1.000 microgramos constituyen una sobredosis que producen una paralización de la actividad de las moscas, por lo

que la escala de dosis se fijó entre 1 y 300 μg . La duración de la respuesta sobrepasa la hora y media, estando la máxima respuesta comprendida entre los minutos 45 y 75 del comienzo del ensayo. El comportamiento de las moscas en los ensayos testigo quedan reflejados con las figuras 6 y 7, en las que se aprecian que, en lo que respecta a activaciones hay un ligero aumento hasta el minuto 40, descendiendo posteriormente. La colonización del tubo se produce en los primeros 20 minutos, manteniéndose prácticamente estable.

Metodología.—Con la experiencia adquirida en los ensayos previos se determinó que cada ensayo tendría una duración de 100 minutos además de los 15 minutos previos de toilette. Los puntos característicos de la evolución del comportamiento fueron los siguientes:

35 minutos: introducción del estímulo y comienzo de la respuesta.

40 a 45 minutos: máximo de activaciones.

55 a 65 minutos: anemotaxis máxima.

85 a 95 minutos: mantenimiento de la respuesta.

95 a 100 minutos: declive de la actividad.

Se realizaron seis repeticiones por tratamiento.

RESULTADOS

Se analizaron por separado los parámetros establecidos «activaciones» y «anemotaxis» y además la situación especial de este último «moscas en la malla».

Activaciones: En los cuatro puntos característicos siguientes: $t = 40$, $t = 60$, $t = 65$ y $t = 100$ minutos, se realizó la transformación de activaciones totales en raíz cuadrada de los datos (SOUTHWOOD 1965) acompañada del correspondiente análisis de la varianza, resultando en todos los casos significativa la actividad de vuelo con $P < 0,05$ a los 40 minutos y con $P < 0,001$ en los otros tres.

A continuación y para comparar la actividad de vuelo a las diferentes concentraciones de los atrayentes se empleó el test de Student-Newman Keuls (rangos estudentizados). Resultando con $P < 0,05$ que existen diferencias significativas entre los tratamientos (fig. nº 8) en $t = 60$ minutos.

Para los tiempos de 40, 65 y 100 minutos las significaciones se resumen en el siguiente cuadro:

	TR 30	TR 10	SC 100	SC 1	SC 10	SC 30
SC 300	65' y 100'	65' y 100'	—	—	65'	65'
TR 100	65' y 100'	65'	—	—	—	—
T	40' y 100'	40' y 100'	40'	40'	—	—
SC 100	100'	—	—	—	—	—
SC 1	100'	—	—	—	—	—
SC 30	100'	—	—	—	—	—
SC 10	100'	—	—	—	—	—
TR 10	100'	—	—	—	—	—

Anemotaxis o desplazamiento en el tubo.—Con los datos de la distribución de moscas en cada una de las nueve zonas de la cámara de vuelo se calcula el R-75 correspondiente, como tanto por ciento de la lon-

gitud de tubo colonizado por el setenta y cinco por ciento de las moscas, transformándose a arco, seno $\sqrt{\quad}$ (SOUTHWOOD 1966). A continuación se realizó el análisis de la varianza resultando altamente significativo con $p < 0,001$ en todos los puntos de tiempo considerados.

Posteriormente se aplicó el test de Student-Newman-Keuls como en el caso anterior, resultando con $p < 0,005$ las significaciones entre tratamientos que se recogen en las figuras nº 9, 10, 11, 12 y 13. Los histogramas que tienen alguna letra diferente presentan diferencia significativa.

Como complemento a los histogramas y significaciones de las figuras anteriormente citadas acompañamos al cuadro correspondiente a $t = 95$ minutos.

	SC 30	TR 100	SC 100	SC 10	TR 30	SC 300	TR 10	T
SC 1	X	X	X	X	X			
T	X	X	X	X	X			
TR 10	X	X	X	X				
SC 300	X							
TR 30	X							
SC 10								
SC 100								
TR 100								

ACTIVACIONES

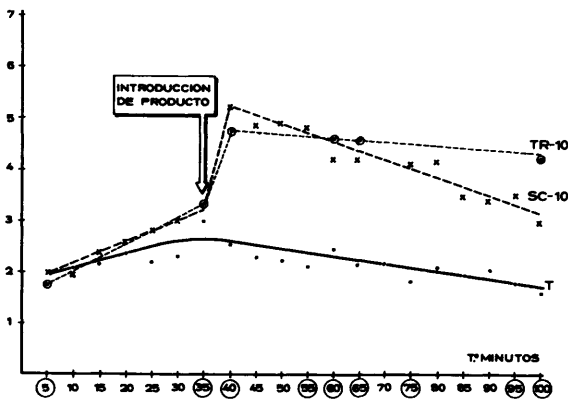


Fig. 6.—Evolución del parámetro «activaciones» para la dosis de 10 microgramos de Sex-Ceratitis (SC 10) y de Trimedlure comercial (TR 10) y el testigo (T) a lo largo de los cien minutos del ensayo.

R 75: ANEMOTAXIS

FIG-7

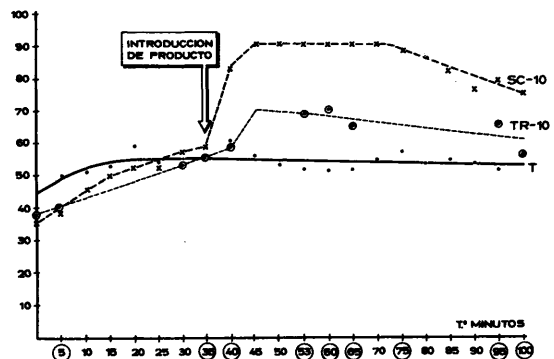


Fig. 7.—Evolución del parámetro «anemotaxis» para la dosis de 10 microgramos de Sex-Ceratitis (SC 10) y de Trimedlure comercial (TR 10) y el testigo (T) a lo largo de los cien minutos del ensayo.

En el que la (x) en un cuadro expresa diferencia significativa entre los tratamientos. Las medias obtenidas por cada tratamiento se colocan en la línea horizontal superior en orden decreciente de izquierda a derecha y en la vertical en orden creciente de arriba a abajo.

Moscas en la malla.—Los porcentajes de moscas posadas en la malla a los 60 y 95' fueron transformados, como en casos anteriores, mediante arc. sen. $\sqrt{\quad}$ seguido del correspondiente análisis de la varianza. Siendo en ambos casos significativo ($p < 0,001$). A continuación, se volvió a aplicar el test de Newman-Keuls, representándose en las figuras 15 y 16 la significación entre concentraciones y productos ($p < 0,05$).

Por último, se llevaron a un mismo gráfico los dos parámetros, activaciones y anemotaxis, en él se puede seguir la evolución

de ambos entre los tiempos $t = 5$, $t = 40$, $t = 60$ y $t = 100$ (Fig. 18).

DISCUSION

Los resultados obtenidos de la actividad del vuelo (*activaciones*) de los machos con los productos y dosis del ensayo (fig. 8), concuerda en principio con la previsión esperada de que una baja dosis produce una baja respuesta que se va incrementando con las dosis hasta un máximo y luego desciende por debajo de la del testigo a partir de una determinada alta concentración de atrayente que produce paralización.

Para Sex-Ceratitis la dosis óptima en activación está comprendida entre 10 y 30 μg . y la paralización comienza a partir de los 100 μg . Tras el análisis estadístico, se deduce que las

ACTIVACIONES

T = 60 MIN.

FIG- 8

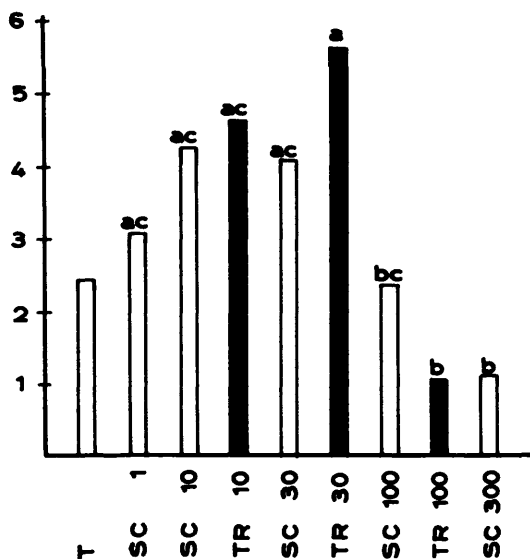


Fig. 8.—Histogramas de «activaciones» en el minuto 60 de todos los tratamientos (Histogramas que tienen alguna letra diferente presentan diferencia significativa).

R-75 ANEMOTAXIS

T = 40 MIN.

FIG-9

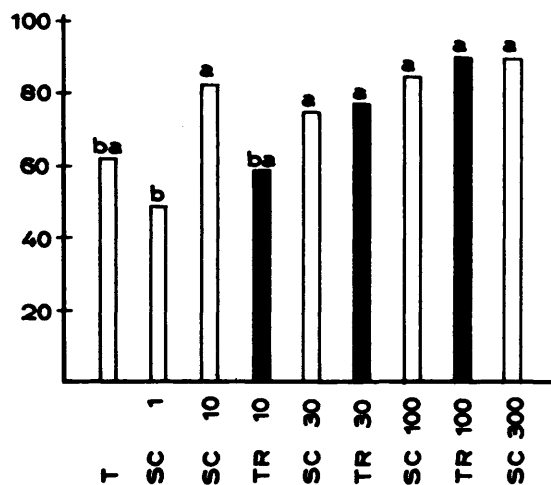


Fig. 9.—Histogramas de «anemotaxis» en el minuto 40 de todos los tratamientos.

dosis desde 1 μg . a 30 μg . de Sex-Ceratitits y Trimedlure comercial producen respuestas en la actividad de vuelo de los machos que no son diferentes significativamente, pero si existe diferencia significativa entre ellas y las dosis altas superiores a 100 μg . que producen paralización de la actividad.

El Trimedlure comercial parece producir más activación y más paralización pero no significativamente diferentes de la provocada por Sex-Ceratitits.

En la figura 6, se expresa gráficamente la evolución de las activaciones a lo largo del tiempo de ensayo para el testigo y dos dosis iguales de ambos productos.

El acercamiento de los machos hacia la fuente del atrayente (*anemotaxis*) se expresa gráficamente en la figura 7, para el testigo y las dosis de 10 μg . de ambos productos, valorándose en este caso la respuesta más alta y su mantenimiento a lo largo del tiempo.

El análisis estadístico de los resultados nos indica que las dosis entre 30 y 300 μg . de ambos productos y Sex-Ceratitits a 10 μg . producen respuestas sin diferencias significativas en el movimiento hacia la fuente del estímulo a lo largo de los sesenta y cinco minutos de difusión del atrayente, pero sí existe diferencia significativa entre Sex-Ceratitits a 10 μg . y Trimedlure a 10 μg . lo que quiere decir que el nuevo producto iguala en eficacia a una dosis como mínimo triple del producto de referencia, sobrepasando significativamente la misma dosis con $p < 0,005$.

El tercer parámetro estudiado: *moscas posadas en la malla*, es decir, en la fuente del estímulo, es aún más definitorio ya que como puede observarse en la figura 16, no habiendo diferencias significativas en las respuestas de ambos productos a 30 y 100 μg ., anteriormente a $t = 95'$ a partir de este momento la dosis de Sex-Ceratitits de 30 μg .

R-75 ANEMOTAXIS
T= 55 MIN.

FIG-10

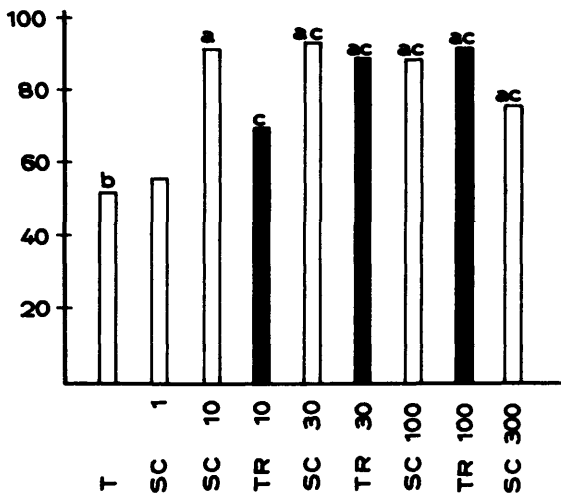


Fig. 10.—Histogramas de «anemotaxis» en el minuto 55 de todos los tratamientos.

R-75 ANEMOTAXIS
T= 60 MIN.

FIG-11

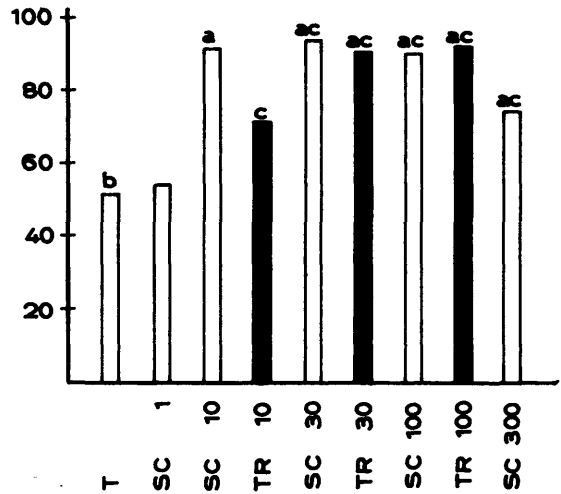


Fig. 11.—Histogramas de «anemotaxis» en el minuto 60 de todos los tratamientos.

R-75 ANEMOTAXIS FIG-12
T= 65 MIN.

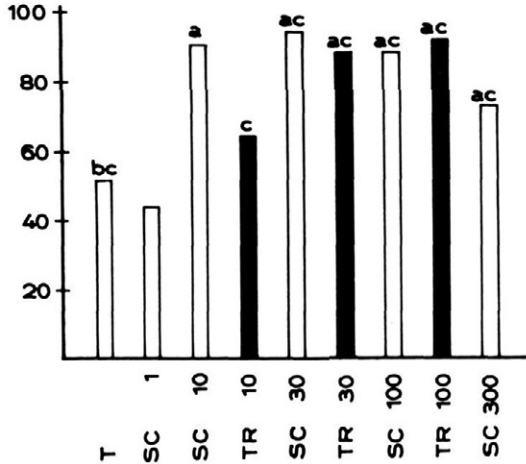


Fig. 12.—Histogramas de «anemotaxis» en el minuto 65 de todos los tratamientos.

R-75 ANEMOTAXIS FIG-13
T= 95 MIN.

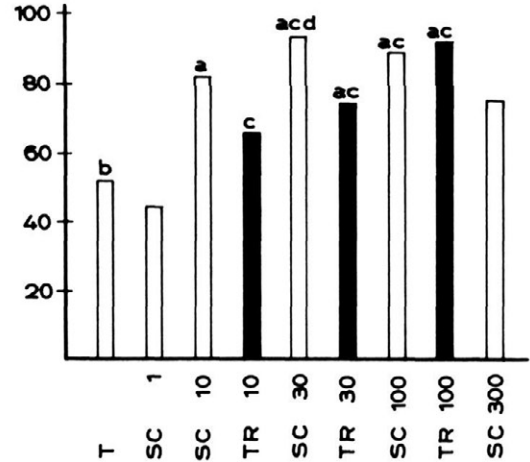


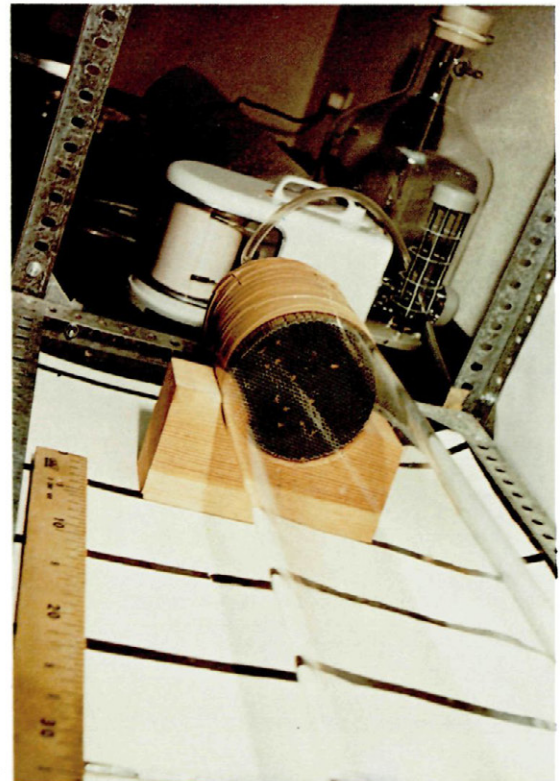
Fig. 13.—Histogramas de «anemotaxis» en el minuto 95 de todos los tratamientos.

mejora la respuesta de Trimedlure a 100 μg . y es significativamente superior a las demás dosis y productos, lo que quiere decir que el nuevo producto supera en eficacia a una dosis como mínimo triple del Trimedlure comercial y que la dosis ideal de Sex-Ceratitís es la de 30 μg .

En la figura 18, hemos representado los dos parámetros: activaciones y anemotaxis en un sistema cartesiano en el que se recoge la evolución de las respuestas producidas por dos dosis: 10 y 30 μg . de ambos productos representándose los puntos característicos $t = 5$, $t = 40$, $t = 60$ y $t = 100$ minutos.

En este sistema de representación un buen atrayente debe describir un bucle en el sentido contrario a las agujas del reloj manteniendo al final una alta anemotaxis bajando las activaciones lo que es indicativo de que muchos machos están posados en la malla, fuente del estímulo.

Fig. 14.—Detalle del olfactómetro en el que se aprecian los machos en la malla.



MACHOS EN LA MALLA

T= 60 MIN.

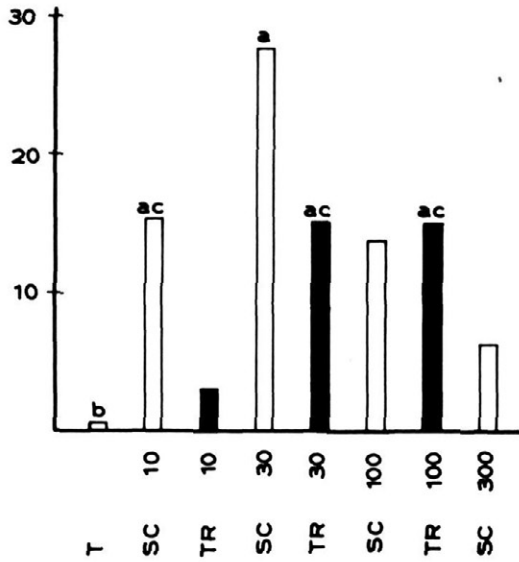


Fig. 15.—Histogramas de «machos en la malla» de todos los tratamientos en el minuto 60.

MACHOS EN LA MALLA

T= 95 MIN.

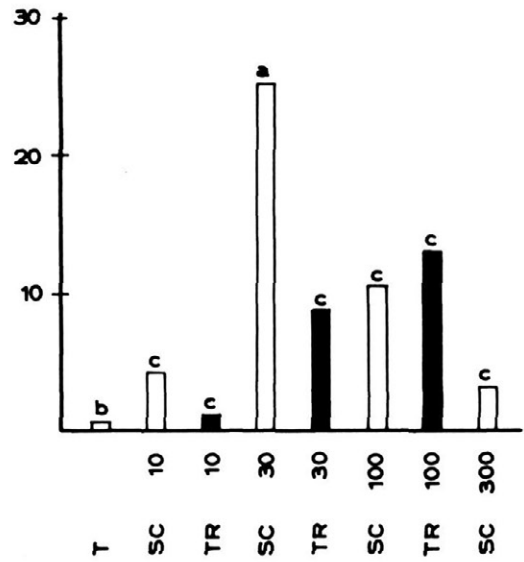
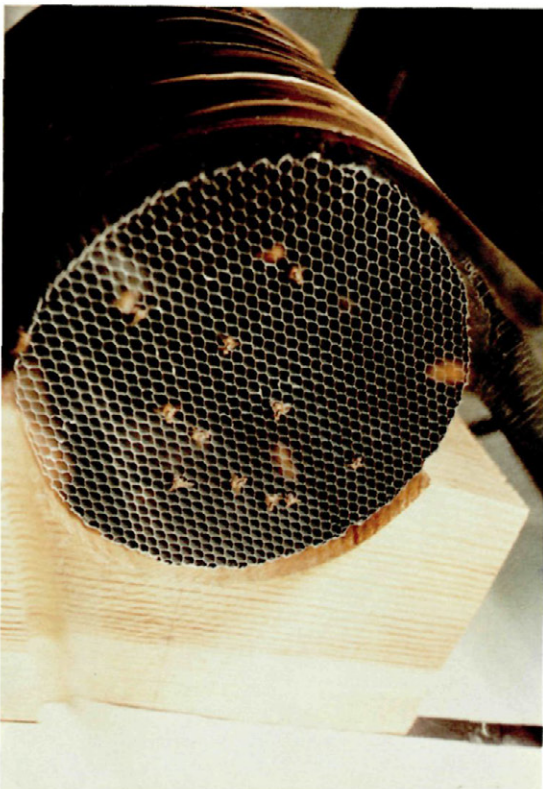


Fig. 16.—Histogramas de «machos en la malla» de todos los tratamientos en el minuto 95.

Fig. 17.—Detalle de los «machos en la malla» en el olfatómetro.



R-75 ANEMOTAXIS

FIG-18

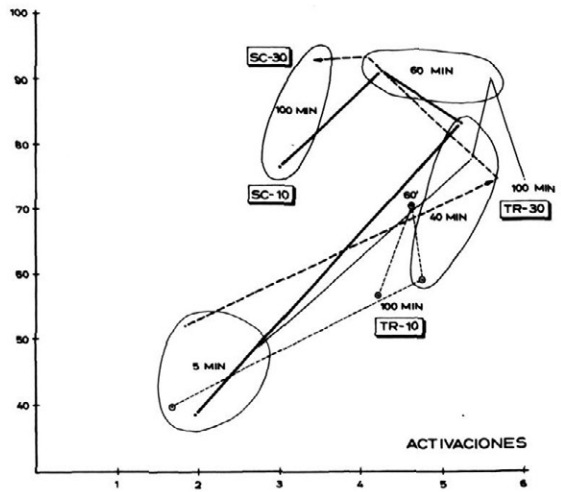


Fig. 18.—Diagrama de «activaciones» - «anemotaxis» para las dosis de 10 y 30 microgramos de Sex-Ceratitis (SC 10 y SC 30) y de Trimedlure comercial (TR 10 y TR 30) en los puntos característicos t=5, t=40, t=60 y t=100 minutos.

CONCLUSIONES

La activación parece ser un parámetro poco definitorio de la eficacia de un producto ya que de poco vale que los machos vuelen mucho si no se acercan a la fuente del estímulo, desde el punto de vista de su utilización comercial; sin embargo, pensando en el método de lucha por confusión, sería interesante el estudio de la persistencia y de dosis altas que producen paralización.

Del resto de los parámetros estudiados se concluye que Sex-Ceratitís mejora la eficacia

de dosis triples del Trimedlure comercial y que la dosis óptima en nuestras condiciones de ensayo es la de Sex-Ceratitís a 30 µg.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Agrarias por sus periódicos envíos de insectos. Al capataz del Servicio don José Vacas Fernández por su ayuda en el manejo de las moscas.

ABSTRACT

GARCÍA BENAVIDES, P., SERRANO VILAR, J. y GARCÍA BENAVIDES, J. Pruebas de comportamiento de *Ceratitís capitata* Wied. con Sex-Ceratitís producto nacional atrayente sexual de machos. *Bol. Serv. Plagas*, 10: 3-15.

In this work we study the response of mediterranean fruit fly *Ceratitís capitata* Wied. as method to know the efficacy of Sex-Ceratitís (new attractant synthesized in Spain). For this purpose, handling olfactometric techniques and using two principal parameters: *Fly activity* and *anemotaxis*, equivalent concentrations of Sex-Ceratitís and trimedlure are compared. The bioassays gave significant results, concluding that Sex-Ceratitís get better efficacy than three times concentrations of Trimedlure.

REFERENCIAS

- CAUSSE, R., FERÓN, M., 1967: Influence du rythme photopériodique sur L'activité sexuelle de la mouche méditerranéenne des fruits; *Ceratitís capitata* Wiedemann (Diptera Trypetidae). *Ann. Epiphytcs*, 18 (2): 175-192.
- FERÓN, M., 1962: L'instinct de reproduction chez la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitís capitata* Wied (Dip. Trypetidae). Comportement sexuel. Comportement de Pont. *Re vue Path. veg. Entomol. Agric. Fr. T.*, XLI n° 1 y 2.
- FLETCHER, B. S., 1977: Behavioral responses of diptera to pheromones, allomones, and Kairomones. *Chemical Control of Insect Behaviour. Theory and application* (Ed. by H. H. Shorey and J. J. Mckelvey) pp. 129-147 Wiley-Intercience, New York.
- GIANNAKAKIS, A. E., FLETCHER, B. S., 1978: An improved bioassay technique for the sex pheromons of male *Dacus tryoni* (Diptera: Trypetidae). *Canadian Entomologist.*, 110: 125-129.
- JACOBSON, M., OHINATA, K., CHAMBERS, D. L., JONES, W. A. & FUJIMOTO, M. S., 1973: Insect sex attractants, 13, Isolation identification and synthesis of sex pheromones of the Mediterranean fruit fly. *Journal of Medicinal Chemistry*, 16: 248-251.
- JONES, O. T., LOMÉR, R. A., HOWSE, P. E., 1981: Responses of male Mediterranean fruit flies, *Ceratitís capitata*, to trimedlure in a Wind tunnel of novel design. *Physiological Entomology*, 6: 175-181.
- KENNEDY, J. S., 1977: Olfactory responses to distant Plants and other odor sources. *Chemical Control of*

- Insect Behaviour. Theory and application* (ed. by H. H. Shorey and J. J. McKelvey). pp. 67-91.
- KOBAYASHI, R. M., OHINATA, K., CHAMBERS, D. I. & FUJIMOTO, M. S., 1978: Sex pheromones of the oriental fruit fly and the melon fly: Mating behaviour, bioassay method, and attraction of females by live males and by suspected pheromone glands of males. *Environmental Entomology*, 7: 107-112.
- NATION, J. L., 1972: Courtship behaviour and evidence for a sex attractant in the male caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Annals of the Entomological Society of America*, 65: 1364-1367.
- OHINATA, K., FUJIMOTO, M. S., CHAMBERS, D.L., JACOBSON, M. & KAMAKAHI, D. C., 1973: Mediterranean fruit fly: bioassay techniques for investigating sex pheromones. *Journal of Economic Entomology*, 66: 812-814.
- ROHLF, F. J., SOKAL, R. R., 1936: *Statistical tables*, 2.^a ed. pp. 122-123 y 134.
- SOKAL, R. R., ROHLF, F. J.: *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. pp. 227-276.
- SOUTHWOOD, T. R. E., 1966: *Ecological Methods*. Methuen, London.