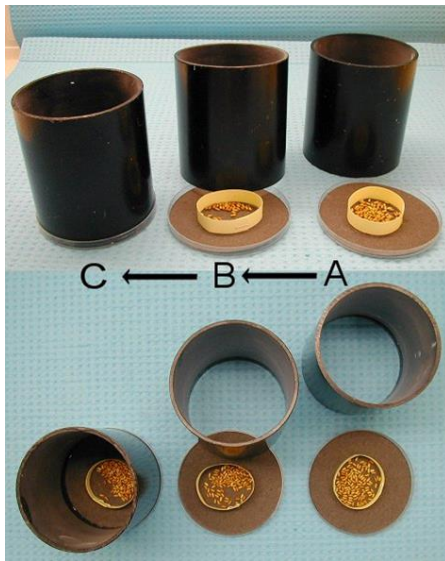


# Manual de Control de Calidad del Producto en la Cría masiva y Liberación de Moscas de la Fruta Estériles



**2022**

**(traducción de la Versión 7.0 de 2019)**

AIEA, Viena, Austria



## Preámbulo para la Versión 7.0

Desde 1997, el manual de FAO/IAEA/USDA sobre “Control de Calidad del Producto y Procedimientos de Envío para Moscas de la Fruta Estériles Producidas Masivamente” ha proporcionado y continúa proporcionando un conjunto de estándares objetivos para evaluar la calidad de las moscas de la fruta estériles utilizadas en programas que aplican la Técnica del Insecto Estéril (TIE). El manual aborda una necesidad esencial de quienes trabajan en programas de control de moscas de la fruta para medir el desempeño de los insectos estériles en conjunto con otras actividades operativas. El uso de insectos de buena calidad equivale a un control exitoso de plagas. Por el contrario, el uso de insectos de baja calidad puede conducir a una falta de control efectivo y a mayores costos del programa. La medición de la calidad de los insectos en el campo es la única forma de proporcionar información a las plantas de cría masiva para que puedan modificar los protocolos de cría para mejorar la calidad de los insectos.

Los procedimientos establecidos en este manual se basan en hallazgos científicos publicados en su mayor parte. En ausencia de éstos, la opinión de expertos basada en muchos años de experiencia en programas de acción que aplican la TIE y en el consenso alcanzado a través del diálogo abierto, también desempeñaron un papel determinante de las metodologías aquí recomendadas. Esto es particularmente importante cuando existen envíos transfronterizos que implican la liberación de insectos estériles. También refuerza la confianza en la producción y uso de insectos estériles, especialmente cuando se trata de inversiones del sector privado en instalaciones de cría masiva y liberación de moscas.

Este manual es un documento que está sujeto a actualizaciones periódicas; la más reciente versión está disponible en el Internet en <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/manuals-ipc.html>. Los siguientes eventos y actividades han guiado a la actual versión de este manual:

- 2000-2004 FAO/IAEA Coordinated Research Project: Quality Assurance of Mass Produced and Released Fruit Flies
- 2003-2009 FAO/IAEA Coordinated Research Project: Development of Mass Rearing for New World (*Anastrepha*) and Asian (*Bactrocera*) Fruit Flies.
- 2003-2009 FAO/IAEA Coordinated Research Project: Improving Sterile Male Performance in Fruit Fly SIT programmes.
- 2004, 2006, 2008 and 2012. Meetings of the Working Group on Fruit Flies of the Western Hemisphere.
- 2005 “Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management” is published. V.A. Dyck, J. Hendrichs and A.S. Robinson (eds.). 787 pp.
- 2006, 2010, 2014 and 2018 . 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> International Symposia on Fruit Flies of Economic Importance.
- 2007 “Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation” is published. M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson and J. Hendrichs (eds.) 789 pp.

- 2007 FAO/IAEA Coordinated Research Project: Quality Assurance of Mass Produced and Released Fruit Flies (Proceedings published as a special issue in the Florida Entomologist).
- 2007 FAO/IAEA “Guidance for packing, shipping, holding and release of sterile flies in area-wide fruit fly control programmes” is published. W Enkerlin (ed.). 134 pp.
- 2008 and 2013. Tephritid Workers of Europe Africa and the Middle East meeting with proceedings in a special issue in the Journal of Applied Entomology.
- 2009. USDA-APHIS. United States, Mexico and Guatemala Fruit Fly Emergence & Release Facilities Review - Final Report. Conducted July 2008. 81 pp.
- 2012. Santiago Martínez, G. et al. Manual de Control de Calidad de moscas esteriles: Procedimientos para evaluar el producto en centros de empaque. Dirección de Moscas de la Fruta, DGSV-SENASICA, SAGARPA 34 pp.
- 2013. “The FAO/IAEA Spreadsheet for Designing and Operation of Insect Mass Rearing Facilities”, C. Cáceres, P. Rendón and A. Jessup (ed.). FAO, Rome, Italy, 48 pp.
- 2013. Jorge C. Guillen Aguilar *et al.* “Manual to Differentiate Wild, Fertile Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata*, from Irradiated, Sterile TSL flies”, FAO/IAEA, Vienna, Austria, 55 pp.
- 2016 FAO/IAEA. “Guidelines for the Use of Mathematics in Operational Area-Wide Integrated Pest Management Programmes Using the Sterile Insect Technique with a Special Focus on Tephritid Fruit Flies”. Barclay H.L., Enkerlin W.R., Manoukis, N.C. Reyes-Flores, J. (eds.), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 95 pp.
- 2018. FAO/OIEA. Manual para diferenciar moscas de *Anastrepha ludens* (Loew) silvestres y criadas de cepa normal (“bi-sexual”) y cepa sexada genéticamente (Tapachula-7), irradiadas y sin irradiar, by Guillen Aguilar J.C., Lopez Muñoz L., Lopez Villalobos E.F. y Soto Garcia D. N. Viena, 95 pp.
- 2019. FAO/IAEA. Sterile Insect Release Density Calculations Spreadsheet, Rendón P.A, Enkerlin W.R. and Cáceres C. (eds.), Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. 30 pp.

La citación correcta para este documento es:

**FAO/IAEA/USDA. 2022.** Manual de Control de Calidad del Producto en la Cría masiva y Liberación de Moscas de la Fruta Estériles. Traducción de la Versión 7.0 de 2019. *Agencia Internacional de Energía Atómica*, Viena, Austria, 149 pp.

## Tabla de Contenidos

<b>1. Introducción .....</b>	<b>8</b>
1.1. Alcance .....	8
1.2. Antecedentes .....	10
1.3. Razonamiento .....	11
1.3.1. La Necesidad de un Manual de Control de Calidad del Producto en Programas TIE. 11	
1.3.2. Comportamiento de Cópula y Competitividad del Macho Estéril en Campo .....	11
1.3.3. Cambios desde los Primeros Manuales.....	12
1.3.4. Gestión del Control de Calidad del Producto .....	13
1.3.5. Planes Futuros para Actualizar este Manual .....	14
1.4. Análisis de Datos, Presentación y Comunicación .....	14
1.5. Comentarios Generales .....	16
1.6. Agradecimientos .....	16
1.7. Literatura Relevante .....	17
<b>2. Pruebas Rutinarias de Control de Calidad Requeridas en Plantas de Cría Masiva .....</b>	<b>20</b>
2.1. Guía para el Muestreo de Insectos para Pruebas de Control de Calidad de Rutina .....	20
2.2. Pruebas de Control de Calidad después de Cría Masiva (pre-irradiación) .....	22
2.2.1. Peso de Pupa .....	22
2.2.2. Emergencia y Habilidad de Vuelo .....	24
2.2.3. Supervivencia bajo Estrés.....	28
2.3. Pruebas de Control de Calidad Post-irradiación .....	30
2.3.1. Indicador de Irradiación .....	30
2.3.2. Emergencia y Habilidad de Vuelo .....	30
2.3.3. Supervivencia bajo Estrés.....	30
2.3.4. Proporción Sexual y Tiempo de Emergencia .....	30
2.4. Literatura Relevante .....	32
<b>3. Irradiación .....</b>	<b>35</b>
3.1. Estado de Desarrollo / Edad de los Insectos.....	35
3.2. Procedimientos Pre-irradiation .....	36
3.3. Irradiación y Control de Procesos .....	39
3.4. Dosimetría.....	42
3.5. Literatura Relevante .....	43
<b>4. Procedimientos de Empaque y Envío .....</b>	<b>45</b>
4.1. Procedimientos de Empaque .....	45
4.2. Procedimientos de Envío y de Manejo .....	48
4.3. Documentos de Envío .....	49
4.4. Literatura Relevante .....	50
<b>5. Pruebas de Control de Calidad de Rutina en los Centros de Emergencia y Liberación de Moscas .....</b>	<b>51</b>
5.1. Guía para el Muestreo de Insectos para Pruebas de CC de Rutina .....	51

5.2. Pruebas de Control de Calidad al Arribo .....	51
5.2.1. Indicador de Radiación .....	52
5.2.2. Peso de Pupa .....	52
5.2.3. Emergencia y Habilidad de Vuelo .....	52
5.2.4. Supervivencia bajo Estrés.....	53
5.2.5. Proporción Sexual y Tiempo de Emergencia .....	54
5.3. Control de Calidad Post Manejo/Enfriamiento .....	54
5.3.1. Voladoras.....	54
5.3.2. Supervivencia bajo Estrés de Moscas Enfriadas / Liberadas.....	56
5.4. Control de Calidad después de la Liberación.....	57
5.4.1. Adultos Voladores .....	57
5.4.2. Prueba de Supervivencia después de Liberación .....	58
5.5. Literatura Relevante .....	59
<b>6. Pruebas de Control de Calidad Periódicas Requeridas en Plantas de Cría Masiva y / o Centros de Emergencia de Moscas y Liberación .....</b>	<b>60</b>
6.1. Prueba de Esterilidad .....	60
6.2. Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo .....	62
6.3. Prueba de Liberación-Recaptura de Dispersión y Supervivencia .....	80
6.4. Prueba de Irritabilidad .....	84
6.5. Literatura Relevante .....	86
<b>7. Pruebas Auxiliares.....</b>	<b>93</b>
7.1. Prueba de Actividad .....	93
7.2. Observaciones Detalladas de Comportamiento de Cortejo y Lek.....	94
7.3. Prueba de Llamado de Feromonas .....	96
7.4. Prueba de la Propensión de las Hembras a la Recópula.....	97
7.5. Prueba de Fried en Jaula .....	99
7.6. Prueba de Fried en Campo .....	102
7.7. Supervivencia en Jaulas de Campo .....	104
7.8. Diámetro de Pupa .....	106
7.9. Supervivencia en Campo.....	108
7.10. Literatura Relevante .....	109
<b>8. Formas para Registrar Datos de Control de Calidad .....</b>	<b>110</b>
8.1. Formulario de Evaluación del Peso de Pupa.....	110
8.2. Formulario de Evaluación de Emergencia y Habilidad de vuelo.....	111
8.3. Formulario de Evaluación de Supervivencia bajo Estrés .....	112
8.4. Formulario de Evaluación de la Proporción Sexual y Tiempo de Emergencia .....	113
8.5. Formulario de Evaluación de Esterilidad .....	115
8.6. Formulario de evaluación de Desempeño de Cópula.....	116
8.7. Representación Gráfica de los Índices de Desempeño de Cópula .....	117
8.8. Formulario de Evaluación de Irritabilidad de Moscas .....	118

<b>Apéndice A: Cronología del Control de Calidad del Producto de Moscas Tefritidas para su Uso en Programas TIE .....</b>	<b>119</b>
<b>Apéndice B: Fuentes Conocidas de Equipos y Suministros Clave .....</b>	<b>123</b>
<b>Apéndice C: Terminología .....</b>	<b>126</b>
<b>Apéndice D: Envíos Transfronterizos de Insectos Estériles .....</b>	<b>131</b>
<b>Apéndice E: Historia de Envíos Transfronterizos de Moscas de la Fruta Tefritidas (1963-2015) .....</b>	<b>147</b>

# 1. Introducción

## 1.1. Alcance

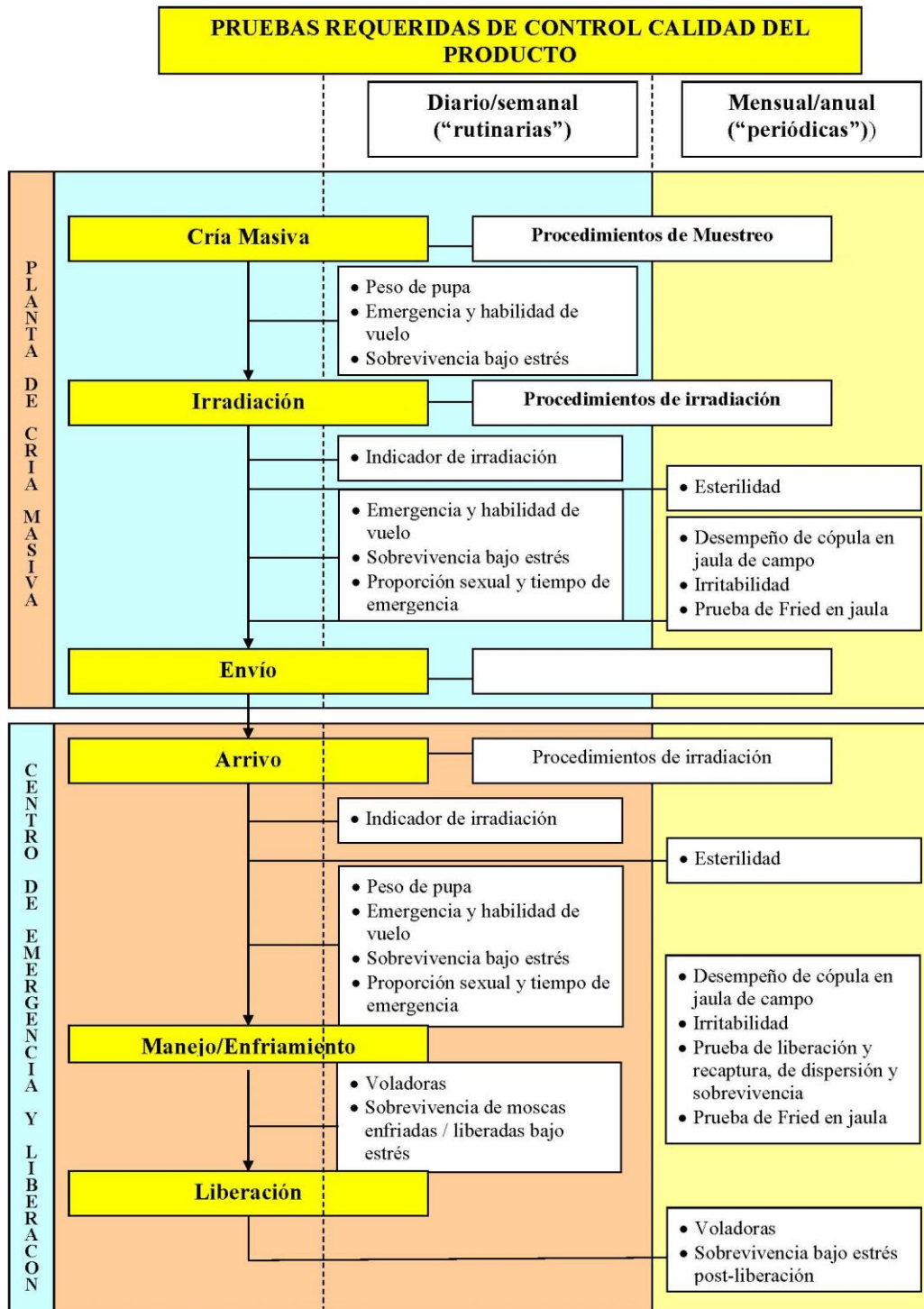
Este documento representa las recomendaciones alcanzadas por consenso de un grupo internacional de expertos en control de calidad, acerca los procedimientos estándares para el control de calidad del producto (CC) de moscas tefrítidas estériles criadas masivamente y liberadas en programas de la Técnica del Insecto Estéril (TIE), ya sea en plantas de cría masiva como en centros de emergencia y liberación. Este manual describe los procedimientos recomendados para el muestreo, irradiación, dosimetría, empaque y envío. También se presenta un diagrama de flujo con la secuencia de pruebas de control de calidad periódicas y de rutina que se deben llevar a cabo en las plantas de cría masiva y en los centros de emergencia y liberación de moscas (**Figura 1.1**).

La mayoría de los procedimientos fueron inicialmente diseñados para la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Wied.), pero ahora se incluyen con modificaciones menores para otras especies de tefrítidos de los géneros *Anastrepha* y *Bactrocera*.

Si se siguen, las pruebas y procedimientos descritos en este manual, ayudarán a asegurar que la calidad de las moscas de producción masiva se determine de manera precisa y estandarizada, permitiendo comparaciones a través del tiempo así como entre plantas de cría y programas de campo. Los problemas en cría, irradiación, empaque, envío, manejo, liberación y calidad de las moscas estériles, a menudo se pueden identificar al monitorear de cerca los resultados de CC, permitiendo realizar correcciones antes de que los programas de campo se vean afectados. Aunque las pruebas rutinarias y periódicas de control de calidad pueden revelar cambios medibles (tanto positivos como negativos), a veces no es fácil identificar la causa de la reducción en el rendimiento o en la calidad. Por ejemplo, el peso del insecto, la capacidad de vuelo y la propensión a la cópula pueden verse afectados por una o múltiples causas. Sin embargo, cualquier disminución repentina o cambios que den resultados inferiores a los esperados, deberán estimular una búsqueda para identificar las posibles causas. Las pruebas de CC también juegan un rol importante en el monitoreo y medición de la recuperación a niveles normales.

Las pruebas y los procedimientos descritos en este documento son parte de un programa de control de calidad total para la producción y liberación de moscas tefrítidas, pero también se puede usar como una validación para el aseguramiento de la calidad de los procesos de cría y liberación. Una lista de plantas de cría de moscas alrededor del mundo está disponible en: <http://nucleus.iaea.org/dirsit/> en el cual se le solicita a cada planta para actualizar sus procedimientos operativos. Las evaluaciones de control de calidad *del producto* incluidas en este manual están pensadas para llevarse a cabo tanto en las instalaciones de cría masiva como en las de emergencia y liberación. Ambas partes se benefician al evaluar y comparar los resultados de las pruebas de control de calidad realizadas para ver: (1) efectos positivos en el desempeño de la mosca estéril que pueden resultar en mejoras en la producción (evaluaciones de nuevas cepas; suplementos nutricionales, microbiológicos, semioquímicos, hormonales, etc.), y (2) qué pérdida de calidad pudo haber ocurrido durante el empaque, envío, confinamiento y liberación.





**Figura 1.1** Diagrama de flujo del control de calidad del producto para moscas tefritadas estériles criadas en masa y liberadas.

Se han desarrollado pruebas adicionales de control de calidad del producto y su uso es opcional (consulte el Capítulo 8 Pruebas auxiliares). Estas pruebas tienen más carácter de investigación y deben realizarse principalmente para comprender las causas de problemas específicos. Otras evaluaciones de *producción* y *proceso*, por ejemplo, análisis de

componentes de la dieta, monitoreo del ambiente de cría, rendimiento de larvas, tasa de desarrollo, etc.), no están dentro del alcance de este documento. Procedimientos operativos estándar (POS) utilizados por las plantas de cría masiva para evaluar el CC de la producción y el proceso, están disponibles en línea en: <http://nucleus.iaea.org/ididas/>

Este manual continúa evolucionando y está sujeto a actualizaciones periódicas. Las adiciones futuras incluirán nuevas pruebas, otras especies de moscas de la fruta y / o estadios en las que se deben realizar las pruebas a medida que se identifique la necesidad y los datos estén disponibles. Las versiones anteriores del manual contenían especificaciones de aceptabilidad mínima y media de cepas convencionales y de sexado genético para las principales especies tefritidas objetivo de la TIE. (e.g. *C. capitata*, y algunas especies *Bactrocera* y *Anastrepha*). Las actualizaciones de los niveles de aceptabilidad y la incorporación de estándares de nuevas especies se basan en información provista por las instalaciones de cría y liberación de moscas. Esta expansión está siendo impulsada por la necesidad de contar con métodos de control de plagas más compatibles con el ambiente, menores costos en la producción y una mayor disponibilidad de insectos estériles producidos en instalaciones recientemente construidas con mayor capacidad de producción. La inversión del sector privado en la producción y venta comercial de insectos estériles ha avanzado, lo cual se basa en una mayor confianza en la tecnología, pero más importante aún en la calidad del producto. También es importante mencionar que hoy existe una mayor necesidad de alimentos más saludables y nutritivos libres de residuos de plaguicidas para satisfacer una creciente demanda mundial; además de la efectividad demostrada de la TIE en el control de plagas, también existen importantes beneficios ambientales derivados de la reducción del uso de insecticidas.

## 1.2. Antecedentes

Se hizo evidente en varios proyectos TIE en los 60s y 70s, que las moscas de la fruta criadas masivamente no estaban funcionando en el campo como se esperaba. En un esfuerzo por definir y medir el desempeño de moscas criadas masivamente ante las moscas silvestres, varios investigadores desarrollaron pruebas preliminares (Chambers 1975). Los científicos dieron particular atención a los efectos de la radiación gamma en el insecto y en su habilidad para aparearse con éxito. En algunos casos, los insectos criados masivamente no irradiados también tuvieron un pobre desempeño, generando la búsqueda de otras causas del bajo rendimiento, especialmente en los procesos de producción. Por casi 35 años (ver Appendix A: Cronología del control de calidad del producto de moscas tefritidas para su uso en programas TIE), con esfuerzos sistemáticos de muchos grupos y científicos individuales se desarrollaron con éxito una serie de pruebas sencillas y útiles para comparar la calidad de las moscas estériles producidas en diferentes plantas de cría masiva. Esos esfuerzos condujeron a la producción de varios manuales de control de calidad de moscas de la fruta (e.g., Orozco *et al.* 1983, Boller y Chamber 1984, Brazzel *et al.* 1986). Con el incremento en la producción y uso de insectos estériles, y de inversiones públicas y privadas en la construcción de instalaciones de cría y liberación, existe una necesidad continúa de contar con estándares de calidad universalmente aceptados que puedan servir de referencia objetiva para evaluar los insectos estériles. Las pruebas de control de calidad también pueden proporcionar evidencia de la rentabilidad de un programa, lo cual es importante desde el punto de vista presupuestal o de inversión. Como se hizo anteriormente para abordar estas necesidades, la División Conjunta

FAO / OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura convocó una Reunión de Consultores en octubre de 2010 y más tarde en diciembre de 2015 para revisar y actualizar este manual.

### **1.3. Razonamiento**

#### **1.3.1. La Necesidad de un Manual de Control de Calidad del Producto en Programas TIE**

La meta de los programas TIE es reducir o eliminar poblaciones de insectos silvestres. Estos programas son efectivos cuando altas proporciones de hembras silvestres se aparean con machos estériles y por lo tanto no se reproducen. La aplicación exitosa de la TIE requiere que se mantenga en el campo una proporción efectiva de insectos estériles con insectos silvestres.

Los gerentes de programas TIE también necesitan asegurar que, una vez en el campo, los machos estériles compitan de manera efectiva con los machos silvestres, copulen con hembras silvestres y transmitan con éxito su esperma. Esto es especialmente crítico para insectos que, como los tephritidos, tienen un sistema complejo de apareamiento. Métodos efectivos para monitorear y proporcionar retroalimentación oportuna sobre la calidad y competitividad de las moscas de la fruta estériles son indispensables para el éxito de los programas TIE. Hacer esto podría generar ganancias significativas tanto en eficiencia como en efectividad. Por el contrario, el descuido de la calidad de los insectos podría incrementar sustancialmente los costos de los programas y conducir a un control inefectivo de las plagas.

#### **1.3.2. Comportamiento de Cópula y Competitividad del Macho Estéril en Campo**

La competitividad es la capacidad de los machos estériles de competir por hembras fértiles contra machos silvestres de la población objetivo. Los componentes de la competitividad se pueden agrupar en amplias categorías como la habilidad de sobrevivir en el campo, la propensión a la cópula, la compatibilidad de apareamiento y los factores post cópula. La complejidad de estas categorías y su relativa influencia sobre la competitividad del insecto estéril, pueden variar dependiendo de la biología y del sistema de apareamiento de las especies. Un programa integral de control de calidad para los machos criados masivamente (producto final), debe contener un enfoque completo de pruebas diseñadas para establecer la competitividad de la mosca. Las pruebas que se utilizan deben adaptarse a las especies de manera individual y ser apropiadas para cada una de ellas. Con ese fin, las pruebas de control de calidad deben ser capaces de medir parámetros de calidad en cada etapa del proceso, comenzando con la cría masiva, la esterilización, el envío, el arribo al centro de emergencia y liberación de la mosca, el manejo / enfriamiento y la liberación, como se indica en el diagrama de flujo (**Figura 1.1**).

La compatibilidad sexual se define como la interacción exitosa del macho estéril y la hembra silvestre por medio de comportamientos que los unen en la arena de apareamiento, resultando en una transferencia efectiva de esperma y productos de las glándulas accesorias. En los programas TIE para tephritidos, la compatibilidad sexual es esencial debido a dos características principales de sus sistemas de apareamiento. Primero, el comportamiento del macho en estos sistemas es complejo; segundo, las hembras eligen a un compañero entre varios pretendientes. La siguiente discusión sobre el comportamiento de apareamiento es

específica de *C. capitata* pero se relaciona, en principio, con muchos otros tefritidos que están sujetos a operaciones de TIE.

Para ser aceptado por una hembra silvestre, un macho estéril debe ubicar inicialmente un microhábitat adecuado para una arena de apareamiento y luego comenzar a "llamar" (liberar su feromona sexual). Para la mosca del Mediterráneo, el microhábitat generalmente se encuentra en la parte inferior de una hoja bien iluminada, y su localización probablemente implica respuestas a la luz y otros estímulos físicos. La multi-componente feromona presumiblemente juega un papel en el cortejo (ver más abajo), así como en atraer a las hembras no apareadas. Los machos suelen recurrir a pequeñas agregaciones que Prokopy y Hendrichs (1979) denominaron como "leks". Desde entonces, la mayoría de los trabajadores en moscas de la fruta han aplicado el término lek al sistema de apareamiento de *C. capitata* y otros tefritidos tropicales

Cuando una hembra se acerca, el macho comienza su cortejo que puede implicar señales químicas (feromonales), visuales, acústicas y táctiles. Cualitativamente, el ritual es muy estereotipado (casi siempre ocurre el mismo tipo de comportamientos), pero cuantitativamente, hay mucha variación que permiten diferencias claras entre machos como entre poblaciones. Si las hembras muestran interés en el macho durante el cortejo, o si permanecen en la vecindad el tiempo suficiente, el macho generalmente intentará montarla. Si el macho monta a la hembra, ella puede optar por sacudirse en lugar de aparearse. Una hembra generalmente es receptiva al cortejo de varios machos antes de aparearse con uno.

La colonización en laboratorio y la cría masiva pueden provocar cambios en el comportamiento de los machos estériles. Los cambios potencialmente influyen sobre factores como edad de apareamiento, comportamiento de cortejo, la calidad o la cantidad de feromona producida, y la periodicidad diaria (Cayol 2000). Si las hembras silvestres no entran en contacto con, o rechazan a los machos estériles por estos cambios, la competitividad de estos machos puede ser drásticamente reducida, como se mostró para una colonia de laboratorio de más de 40 años (McInnis *et al.* 1996). Algunos de estos cambios tienen bases genéticas; i.e., como resultado de una inadvertida selección o deriva génica en la colonia de cría.

### **1.3.3. Cambios desde los Primeros Manuales**

Como se muestra en el diagrama de flujo de Control de calidad del producto (**Figura 1.1**), el nuevo manual se ha reorganizado en dos partes: (a) plantas de cría masiva y (b) centros de emergencia y liberación de moscas. Las pruebas periódicas y de rutina requeridas se identifican para cada uno de los procesos principales en cada tipo de instalación. Las voladoras absolutas post-manejo / enfriamiento y post-liberación en los centros de emergencia y liberación, se agregaron como pruebas de rutina requeridas. El desempeño de apareamiento en jaulas de campo y la capacidad para evadir depredadores se agregaron como pruebas periódicas en plantas de cría masiva. Las siguientes pruebas de rutina requeridas fueron renombradas: peso de pupa (en lugar de tamaño de pupa); sobrevivencia bajo estrés (en lugar de longevidad bajo estrés). Las pruebas auxiliares se movieron del Apéndice al cuerpo principal del manual como una sección separada (sección 8). Las siguientes pruebas se agregaron como nuevas pruebas auxiliares: prueba de actividad, efecto del enfriamiento

sobre las voladoras absolutas, tiempo de llamado del macho, y la incidencia de recópula. La prueba de apareamiento en laboratorio se ha eliminado del manual.

Manuales previos (Orozco *et al.* 1983, Brazzel *et al.* 1986) pretendían proporcionar procedimientos estandarizados para controles de rutina (diarios, semanales) del producto del proceso de cría. Las pruebas que describieron fueron, en consecuencia, diseñadas para evaluar la emergencia, la capacidad de vuelo, la propensión al apareamiento y los índices de la viabilidad básica de las moscas criadas masivamente. En particular, las pruebas descritas por Brazzel *et al.* (1986) no pretendían abordar la competitividad y la compatibilidad de apareamiento o los factores posteriores al apareamiento, aunque los autores señalaron la necesidad de realizar pruebas periódicas en esas áreas.

En los años siguientes, los resultados de las pruebas descritas por Brazzel *et al.* (1986) aparentemente se equipararon con la calidad y competitividad de la mosca, al menos en los programas TIE de la mosca del Mediterráneo en los Estados Unidos. Investigaciones posteriores (e.g., Hibino e Iwahashi 1989, 1991, Miyatake y Yamagushi 1993, McInnis *et al.* 1996) sugirieron que una disminución en la compatibilidad de apareamiento era no sobrevivir el tiempo suficiente en el campo y una posible causa del bajo desempeño de los machos estériles y, cuando es grave, puede provocar el fracaso de los programas TIE.

En 1997, la FAO / OIEA, el USDA y otros expertos consolidaron las pruebas de control de calidad en un conjunto de normas para su uso internacional en lugar de programas específicos. Se hicieron distinciones entre las pruebas periódicas y de rutina requeridas, así como las que se consideran de naturaleza auxiliar. El objetivo fue identificar algunas pruebas esenciales que también podrían llevarse a cabo de manera simple con materiales accesibles en la mayoría de los países a un costo relativamente bajo. Se adoptó un formato estándar para todas las pruebas: nombre descriptivo, objetivo, discusión, equipo y suministros (cuando corresponda), procedimientos e interpretación. Cada prueba recibió un formato independiente que proporciona flexibilidad para reclasificar, mover o eliminar fácilmente las pruebas existentes, al tiempo que facilita la inserción de nuevas pruebas en el manual, según corresponda.

El ímpetu para revisar el manual actual se deriva de la necesidad de actualizar las especificaciones de desempeño para muchas de las especies y agregar nuevas pruebas, principalmente para los centros de emergencia y liberación de moscas, las cuales ayudarán a una mejor evaluación de la calidad del producto, y a tener mejor información para la toma de decisiones en los programas de TIE. Se han producido varios avances, particularmente en el manejo, empaque y envío, que permiten mejorar la manera en como se mide la calidad del producto en cada paso de la cría masiva, la irradiación, el envío, el arribo, el manejo / enfriamiento y la liberación. Los procedimientos de irradiación y dosimetría para la esterilización por rayos X se han agregado por primera vez.

#### **1.3.4. Gestión del Control de Calidad del Producto**

Pueden surgir conflictos en las plantas de cría masiva con la necesidad de producir cantidades predeterminadas de moscas y al mismo tiempo obtener alta calidad. Los ejemplos incluyen: (1) los intentos de aumentar el nivel de producción pueden reducir el tamaño y la calidad de las moscas estériles, (2) los gerentes de producción pueden no encontrar ventajoso informar o admitir fallas en la calidad, y (3) los gerentes de producción podrían dudar en reemplazar una

cepa antigua con una más nueva, menos adaptada al laboratorio, que inicialmente sería más difícil de criar pero más competitiva en el campo. Debido a estos conflictos, se recomienda fuertemente que el control de calidad del producto en los programas TIE sea realizado por una unidad que no dependa directamente de la producción de las moscas estériles (Calkins *et al.* 1996). La unidad de control de calidad del producto no debe informar al Gerente de Producción sino al Director del programa. Sin embargo, la unidad de control de calidad debe trabajar estrechamente con el personal de cría involucrado en las evaluaciones de control de calidad de producción y proceso, y proporcionar una retroalimentación continua para mantener un proceso de cría eficiente. Las evaluaciones de CC post- irradiación que se llevan a cabo en la planta de producción, deben corroborarse en los centros de emergencia y en los sitios de liberación de campo utilizando la misma metodología.

La parte más importante de un programa de CC es garantizar que los machos estériles criados masivamente interactúen con éxito con las hembras silvestres de la población plaga. Para garantizar que los machos estériles sean competitivos y compatibles con las hembras silvestres, las evaluaciones de campo deben realizarse de forma rutinaria. Estas pruebas deben incluir moscas silvestres colectadas en el área donde se realizarán las liberaciones o en lugares con alta probabilidad de introducción de la plaga. Debido a que esta actividad es crítica para el éxito del un programa, se deben asignar fondos suficientes para este propósito. El personal de tiempo completo dedicado a las evaluaciones de campo deben estar capacitados en aspectos comportamentales y ecológicos de las mosca de la fruta. Tanto el administrador del programa como el usuario final (cada vez más no lo mismo) deben ser responsables de garantizar que se realicen estas pruebas, se envíen informes a las partes interesadas y se tomen las medidas apropiadas.

### **1.3.5. Planes Futuros para Actualizar este Manual**

Desde 1997, se han producido varias revisiones al manual y continuarán en la medida que se mejoren los procesos en la producción, el envío y el uso de insectos estériles. Al respecto, los esfuerzos de la División Conjunta FAO / OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura, especialmente con el patrocinio de proyectos coordinados de investigación a nivel internacional, seguirán impulsando el desarrollo, implementación y mejora de la TIE a nivel mundial.

Este manual y la próxima revisión estarán disponibles en la página de inicio de la División Conjunta FAO / OIEA en Internet ([http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public /ipc-mass-reared-tephritid.html](http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/ipc-mass-reared-tephritid.html)).

### **1.4. Análisis de Datos, Presentación y Comunicación**

Existen procedimientos simples y rutinarios para recopilar y preparar datos sobre la calidad del producto que permiten evaluar los procesos continuos de producción y predecir las tendencias que conducen a una calidad reducida. Se recomienda una mayor atención en la calibración de los equipos para aumentar la confiabilidad de los datos. Además, se debe realizar un análisis profundo de los datos para determinar dónde se pueden simplificar las metodologías y se puede ajustar la frecuencia de las pruebas.

Para lograr esto, las plantas de cría masiva y los centros de emergencia y liberación de moscas deben:

***Preparar un análisis de capacidad de cada una de las variables identificadas en la lista de pruebas de calidad de rutina requeridas.*** Se necesita una muestra de  $\approx 50$  mediciones independientes (lotes separados) de cada parámetro durante un período en el que se cree que el proceso de cría está "bajo control" (cuando la calidad de la mosca es subjetivamente "buena") para establecer un estándar de referencia. Los valores de la media o las proporciones generales de cada uno de esos 50 resultados, se utilizan para calcular una medida de tendencia central (por ejemplo, media general) y los límites de control. Los límites de control inferiores típicos pueden convertirse en un "límite de advertencia" (i.e., establecido en un nivel donde, con una variación normal, se esperaría que las mediciones superen el límite de advertencia el 97.5% del tiempo) y un "límite de acción" (nivel del 99.5%). Para variables continuas (e.g., peso de pupa), los límites de "advertencia" y "acción" serían, por ejemplo, 2 y 3 desviaciones estándar por debajo de la media. Para los datos en los que un individuo cae en una de dos categorías (e.g., emergido o no emergido, macho o hembra), los procedimientos estadísticos basados en la distribución binomial (por ejemplo, gráficos P) pueden ser más apropiados.

***Rutinariamente (e.g., semanalmente) se producen gráficos que rastrean los valores de cada parámetro de CC a lo largo del tiempo.*** Los gráficos deben mostrar los límites de control más bajos y quizás los niveles mínimos especificados en las secciones respectivas de este manual.

***Proporcionar copias de los gráficos a los usuarios y al personal de cría.*** Los valores por debajo del límite de acción, o valores consecutivos por debajo del límite de advertencia, indicarían un problema en los procesos de producción y postproducción que requiere la atención inmediata. En períodos prolongados cuando los valores caen constantemente por debajo del valor central, también indican la existencia de problemas. Los gráficos se deben compartir con los usuarios para una mejor comunicación sobre la calidad de la mosca. El análisis y la cartografía de cada parámetro medido en el centro receptor se realizarán de manera similar para permitir la comparación.

Con los avances en la tecnología informática, el almacenamiento, la manipulación y la representación gráfica de los datos de CC se pueden automatizar fácilmente. Los datos se pueden almacenar convenientemente en bases de datos electrónicas (use sistemas de respaldo seguros), y se pueden diseñar formularios de bases de datos, paneles u hojas de cálculo que imiten los formularios de control de calidad como los presentados en este manual. Las estadísticas como la capacidad de vuelo, el porcentaje de emergencia y la propensión a la cópula se pueden calcular automáticamente lo que reduce la posibilidad del error humano. Los datos se pueden exportar a hojas de cálculo u otras aplicaciones para el análisis de rutina o la producción de gráficos. Hay disponibles varios paquetes de software estadístico que incluyen rutinas específicas para calcular los límites de control y producir gráficos de control de calidad.

Los límites de control son efectivos para identificar desviaciones de los niveles normales en los procesos de producción porque se basan en evaluaciones estadísticas de los datos de producción de una planta, proceso y cepa de mosca determinados.

## 1.5. Comentarios Generales

Una disminución en la eficiencia de la TIE puede originarse en diferentes aspectos relacionados con la calidad de los machos: capacidad para dispersarse, sobrevivir, buscar alimento y nutrientes que deben incorporar como adultos y, por supuesto, cortejar y aparearse con hembras silvestres. Cuando se detecta una reducción en cualquiera de estos aspectos en las plantas de cría, se pueden emprender correcciones. Aumentar el número de insectos liberados es una opción cuando la tasa de supervivencia y la capacidad de dispersión se ven comprometidas. Sin embargo, si la baja calidad de los insectos está relacionada con su capacidad de cortejo y apareamiento con hembras silvestres, cualquier aumento en la tasa de liberación no compensará esta deficiencia por lo que se deben considerar otras acciones correctivas. El conjunto de pruebas proporcionadas en las Pruebas Periódicas y Auxiliares requeridas, proporciona la primera idea de la competitividad general de los machos estériles criados masivamente. Aunque no se realiza para cada lote de moscas, no deben pasarse por alto, y la información obtenida en cada una de ellas debe analizarse junto con los resultados de las otras pruebas. Es recomendable realizar las Pruebas Auxiliares junto con las Pruebas Periódicas Requeridas para tener un panorama más completo de la calidad de las moscas. Sin embargo, sabiendo la cantidad de trabajo que requieren estas pruebas, se recomienda también comparar datos de otros años y, si corresponde, de diferentes centros de emergencia y liberación de moscas que reciben moscas de la misma planta de cría masiva para ajustar la frecuencia en que se deben realizar las pruebas auxiliares.

## 1.6. Agradecimientos

Una versión revisada de Brazzel *et al.* (1986) se utilizó como base para el desarrollo de este documento. Las agencias involucradas en la armonización inicial incluyeron a: FAO/IAEA (Austria), Moscamed-Guatemala (Guatemala), Moscamed-México (México), USDA (APHIS-IS, APHIS-PPQ, ARS), CDFA (California), and FDACS-DPI (Florida).

Los procedimientos y especificaciones descritos en este documento se tomaron de la literatura citada y / o se basaron en trabajos realizados en *Ceratitis capitata*, *Anastrepha*, *Bactrocera* y *Zeugodacus*, por las plantas de cría masiva, emergencia y liberación de moscas y / o laboratorios de investigación en Argentina, Australia, Austria, Chile, Croacia, Grecia, Guatemala, Israel, Japón, Jordania, Mauricio, México, Marruecos, Perú, Filipinas, Portugal, España y los Estados Unidos (California, Florida, Hawái, Texas).

Las actualizaciones de la versión 6.0 de este manual se basaron en una reunión de consultores celebrada en Viena durante octubre de 2010 con expertos en control de calidad de moscas de la fruta de la FAO / OIEA, Argentina, Australia, Guatemala, México y Estados Unidos. La versión 7.0 resultó de una revisión de la versión 6.0 a través de una reunión de consultores celebrada en Viena en diciembre de 2015 con expertos en moscas de la fruta de Argentina, Australia, México y los Estados Unidos.



## 1.7. Literatura Relevante

- Agee, H. R. and D. L. Chambers. 1980. Fruit fly quality monitoring. Nat. Inst. Agric. Sci. 7-15.
- Annual book of ASTM standards, Vol. 12.02 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.
- Bloem, S., K. A. Bloem and A. L. Knight. 1998. Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field release-recapture tests. J. Econ. Entomol. 91: 1122-1130.
- Boller, E. F. and C. O. Calkins. 1984. Measuring, monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Wiedmann) 3. Improvement of quality by selection. Z. angew. Entomol. 98: 1-15.
- Boller, E.F. and D.L. Chambers. 1977. Quality control: an idea book for fruit fly workers. IOBC/WPRS Bull. 1977/5. 162 pp.
- Boller, E. F., U. Remund, B. I. Katsoyannos and W. Berchtold. 1977. Quality control in European cherry fruit fly: evaluation of mating activity in laboratory and field-cage tests. Z. angew. Entomol. 83: 183-201.
- Boller, E. F., B. I. Katsoyannos, U. Remund and D. L. Chambers. 1981. Measuring, monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* Wiedmann. Z. angew. Entomol. 92: 67-83.
- Brazzel, J.R., C. Calkins, D.L. Chambers and D.B. Gates. 1986. Required quality control tests, quality specifications, and shipping procedures for laboratory produced Mediterranean fruit flies for sterile insect control programs. APHIS 81-51, USDA-APHIS, Hyattsville, MD, USA.
- Calkins, C.O., E.F. Boller, D.L. Chambers and Y. Ito. 1979. Quality control in *Ceratitis capitata*: a training manual for the international course on quality control held in Castellon, Spain, 17-27 September, 1979.
- Calkins, C.O., K. Bloem, S. Bloem and D. L. Chambers. 1994. Advances in measuring quality and assuring good field performance in mass reared fruit flies. 85-96. In Calkins, C.O., W. Klassen, and P. Liedo [eds.], Fruit Flies and the Sterile Insect Technique. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Calkins, C.O., T.R. Ashley and D. L. Chambers. 1996. Implementation of technical and managerial systems for quality control in Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) sterile release programs. 399-404. In McPherson, B.A. and G.C. Steck [eds.], Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management. St. Lucie Press, Delray Beach, Florida, USA.
- Chambers, D.L. 1975. Quality in Mass-Produced Insects: Definition and evaluation. pp.19-32. In Controlling Fruit Flies by the Sterile-Insect Technique - Panel Proceedings Series. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, STI/Pub/392
- Chambers, D. L. 1977. Quality control in mass rearing. Ann. Rev. Entomol. 22: 289-308.
- Chambers, D. L. 1980. Review SIRM with special reference to quality control. 1-5. In Proceedings of a Symposium on Fruit Fly Problems. Kyoto & Naha, Japan. August 9-12, 1980. National Institute of Agricultural Services. Yatabe, Ibaraki, Japan.
- Chambers, D.L., C.O. Calkins, E.F. Boller, Y. Ito and R.T. Cunningham. 1983. Measuring, monitoring, and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* Wied. 2. Field tests for confirming and extending laboratory results. Z. angew. Entomol. 95: 285-303.
- Crystal, M. M. and E. Ramirez. 1975. Screw worm flies for sterile-male release: laboratory tests of the quality of candidate strains. J. Med. Entomol. 12: 418-422.
- Crystal, M. M. and C. J. Whitten. 1976. Screw worm flies for sterile-male releases: laboratory observations of the quality of newer candidate strains. Ann. Entomol. Soc. Am. 69: 621-624.

- Dame, D. A. 1989.** The relationship of research to total quality control with special reference to sterile insect technique. *J. Appl. Ent.* 108: 476-482.
- FAO. 2007.** Guidance for packing, shipping, holding and release of sterile flies in area-wide control programmes. *FAO Plant Production & Protection Paper 190*, ed. Walter Enkerlin. pp.134.
- Florida Entomologist. 2007.** Vol 90 (1): 1-179. Includes 24 of 30 papers that comprise the Proceedings of a 5-year FAO/IAEA Coordinated Research Project on Fruit Fly Quality, Control, and Behavior. Edited by C. Cáceres, J. Hendrichs, E. B. Jang, D. O. McInnis, A. S., Robinson, and T. E. Shelly.
- Hibino, Y. and O. Iwahashi. 1991.** Appearance of Wild Females Unreceptive to Sterilized Males on Okinawa Is. in the Eradication Program of the Melon Fly, *Dacus cucurbitae* Coq. (Diptera: Tephritidae). *Appl. Entomol. Zool.* 26 (2): 265-270.
- Hibino, Y. and O. Iwahashi. 1989.** Mating Receptivity of Wild Type Females for Wild Type Males and Mass-Reared Males in the Melon Fly, *Dacus cucurbitae* Coq. (Diptera: Tephritidae). *Appl. Entomol. Zool.* 24 (1): 152-154.
- Huettel, M.D. 1976.** Monitoring the quality of laboratory-reared insects: a biological and behavioral perspective. *Environ. Entomol.* 5: 807-814.
- International Journal of Tropical Insect Science. 2014.** Vol 34 (s1): 1-153 Includes 19 papers that comprise the Proceedings of a 5-year FAO/IAEA Coordinated Research Project on Development of Mass Rearing for New World (*Anastrepha*) and Asian (*Bactrocera*) Fruit Flies. Edited by C. Cáceres, J. Hendrichs and M.J.B. Vreysen.
- Journal of Applied Entomology. 2013.** Vol 137 (s1): 1-259 Includes 28 papers that comprise the Proceedings of a 5-year FAO/IAEA Coordinated Research Project on Improving Sterile Male Performance in Fruit Fly SIT programmes. Edited by J. Hendrichs and R. Pereira.
- Klee, A. 1981.** International meeting on *Ceratitis capitata* quality control. Guatemala, October, 1981.
- Koyama, J. 1982.** Quality problems in the mass-rearing for the melon fly, *Dacus cucurbitae* coquillett. *JARQ.* 16: 181-187.
- Leppla, N.C. and T. R. Ashley. 1989.** Quality control in insect mass production: a review and model. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 23: 33-43.
- Mastangelo T., A.G. Parker, A. Jessup, R. Pereira, D. Orozco-Davila, A. Islam, T. Dammalage and J.M.M. Walder. 2010.** A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *J. Econ. Entomol.* 103(1): 85-94.
- McInnis, D.O., D.R. Lance and C.G. Jackson. 1996.** Behavioral resistance to the sterile insect technique by the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89(5): 739-744.
- Meats, A. 1998.** A quality assurance measure for field survival rates of released sterile flies based on recapture rates. *Gen. Appl. Entomol.* 28: 39-46.
- Miyatake T. and M. Yamagushi. 1993.** Active quality control in mass reared melon flies: quantitative genetic aspects. In: *Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular Genetic Techniques*, pp. 201–213. IAEA Vienna.
- Orozco, D.O., A.G. Schwarz and A. Perez Romero. 1983.** Manual de procedimientos de control de calidad. Dirección General de Sanidad Vegetal, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidraulicos. Talleres Graficos de Nacion. Mexico, D.F., 137pp.
- Programa Regional Moscamed. 2002.** Manual de Control Autocida de la mosca del Mediterraneo esteril por el sistema de adulto frio. 63 pp.

- Prokopy, R.J., and J. Hendrichs. 1979.** Mating behavior of *Ceratitis capitata* on a field-caged host tree. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 642-648.
- Santiago Martínez, G., Orozco Dávila, D., Hernández Ibarra, M., Luis Álvarez, J.H. y Bravo López, J.J. 2012.** Manual de Control de Calidad de Moscas Estériles: Procedimientos para evaluar el producto en centros de empaque. Dirección de Moscas de la Fruta, DGSV-SENASICA, SAGARPA, Mexico, D.F. 34 pp. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=10106>.
- Serghiou, C.S. 1977.** Selected factors affecting the quality of Mediterranean fruit fly used in sterile release programs. *J. Econ. Entomol.* 70: 351-356.
- Smith, P.H., C.A. Konovalov, G.G. Foster and R.W. Kerr. 1981.** Assessment of the quality of mass-reared *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) males treated with dieldrin as larvae in a female-killing procedure. *Bull. Entomol. Res.* 71: 1-10.
- Southwood, T.R.E. 1978.** Ecological methods with particular reference to the study of insect populations (2<sup>nd</sup> Ed.). Wiley & Sons, N.Y., USA.
- SPSS. 1996.** SYSTAT 6.0 for Windows: Graphics. SPSS, Inc., Chicago, IL, USA.
- Stock, M.W. and J.L. Robertson. 1982.** Quality assessment and control in a western spruce budworm laboratory colony. *Entomol. Exp. Appl.* 32: 28-32.
- Tsiropoulos, G.J. 1980.** Quality problems associated with the mass-production of *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt., Trypetidae). *Z. angew. Entomol.* 90: 413-420.
- Tsiropoulos, G.J. and A.G. Manoukas. 1977.** Adult quality of *Dacus oleae* affected by larval crowding and pupal irradiation. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70: 916-918.
- USDA-APHIS. 2009.** United States, Mexico and Guatemala Fruit Fly Emergence & Release Facilities Review - Final Report. Conducted July 2008. pp.81.
- Vreysen M.J.B., A.S. Robinson and J. Hendrichs (eds.). 2007.** Area-Wide Control Insect Pests: From Research to Field Implementation. 792 p.
- Walker, M.L., W.L. McLaughlin, J.M. Puhl and P.J. Gomes. 1997.** Radiation-field mapping of insect irradiation canisters. *Appl. Radiat. Isot.* 48(1): 117-125.
- Zavala, J.L., M.M. Fierro, A.J. Schwarz, D.H. Orozco and M. Guerra. 1985.** Dosimetry practice for the irradiation of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied.). 23-30. In IAEA [ed.] High dose dosimetry, Proceedings of the International Symposium, IAEA STI/PUB/671, IAEA, Vienna, Austria.

## **2. Pruebas Rutinarias de Control de Calidad Requeridas en Plantas de Cría Masiva**

### **2.1. Guía para el Muestreo de Insectos para Pruebas de Control de Calidad de Rutina**

#### **Objetivo**

Obtener una muestra sin sesgo producto y representativa de pupas o adultos para pruebas de CC del de los insectos que serán liberados en programas TIE.

#### **Discusión**

En condiciones óptimas de cría, la calidad de los insectos producidos no deberían diferir significativamente entre un lote y otro, incluso si existe variación entre factores como las características nutricionales o físicas de la dieta, carga microbiana, condiciones microambientales e incluso la técnica personal diferente de cada trabajador. Los grupos de insectos que completan el desarrollo larvario más rápidamente tienden a ser más grandes y de mayor calidad que los que se desarrollan más lentamente. Por eso, un sistema de cría estable dará como resultado un tiempo de desarrollo consistente para todos los estados de vida.

#### **Estrategia de muestreo**

En el CC del proceso que realiza el personal de producción de una planta de cría masiva, la variación entre unidades o grupos de cría es importante porque los datos de las pruebas sirven para resaltar y rastrear problemas de cría o de manejo que pueden evitarse después en lotes futuros. Para que esto sea posible, las muestras se deben tomar sistemáticamente al azar para cada lote de producción y procesar de manera individual.

Los requerimientos para el CC del producto son diferentes. Los datos obtenidos del CC del producto deben proporcionar una indicación precisa de la calidad de las moscas que se envían al campo, de manera que las tasas inundativas de insectos estériles se mantengan. Como se utilizan varios lotes de insectos para realizar un envío en un día determinado, es imperativo que las muestras que se toman para la prueba de control de calidad del producto sean representativas de todo el envío. Para evitar resultados sesgados e inexactos de la pruebas de CC, las muestras de las pupas destinadas a irradiación y envío, deben tomarse de manera aleatoria e independiente de cada lote de producción. Estas muestras deben agruparse para reducir la variabilidad entre muestras y del número de muestras requeridas para lograr el nivel deseado de precisión en la estimación de la media. El CC del producto lo realiza el personal encargado en la planta de cría masiva antes y después de la irradiación, así como el personal del centro de emergencia y liberación de moscas.

#### **Procedimiento**

Para ser útil, las medias de los parámetros evaluados necesitan ser estimadas con cierta precisión. Existen numerosas fórmulas disponibles para estimar el número de muestras requeridas para lograr el nivel requerido de precisión. Todas requieren que la media, la desviación estándar y el error estándar de la media sean calculadas de las muestras (u obtenidas de datos recientes).

La precisión de la media puede ser estimada y el número de muestras necesario para alcanzar el nivel deseado de precisión pueden ser calculados por la fórmula:

$$n_E = \left( \frac{s}{E\bar{x}} \right)^2$$

donde  $n_E$  es el número de muestras requerido

$s$  es la desviación estándar de la media

$E$  es el nivel de precisión requerido (o el error estándar expresado como una proporción decimal de la media).

Por ejemplo, se pesan 20 muestras de 100 pupas para obtener 20 estimaciones de la media del peso de la pupa para un día de envío. La media y la desviación estándar de estas 20 muestras son computadas y estos valores se usan en la fórmula de arriba. En el caso de *C. capitata* se asume que la media y la desviación estándar serán  $8 \pm 1.5$  mg.

Para tener una confianza del 95% de que la estimación del peso medio de la pupa es precisa dentro de  $\pm 0.1$  mg, el error estándar sería  $\approx 0.1 / 1.96$  (donde 1.96 se relaciona con el intervalo de confianza del 95% sobre la media), o 0.05 mg.  $E$  sería igual a  $0.05 / 8$ , o  $\approx 0.006$ , y el número de muestras requeridas se estimaría en  $(0.15 / (0.006 * 8))^2 = 9.77$  (es decir, 10 muestras).

Si este procedimiento se repitiera varias veces en días diferentes con resultados similares, se podría establecer un protocolo para tomar muestras de pupas para determinar el peso de las pupas con un peso de 10 muestras de 100 pupas cada una. La fórmula de arriba para  $n_E$  será suficiente si se toman muestras aleatorias o agrupadas (como se describió anteriormente). Sin embargo, si se utilizan esquemas de muestreo estratificado se necesitarán fórmulas más complejas para estimar el tamaño de muestra requerido. En ese caso no se recomienda este enfoque.

Hay una tendencia a tomar muchas más muestras de las necesarias en un esfuerzo por aumentar la precisión de la estimación de la media. Sin embargo, de la relación  $SE = s / \sqrt{n}$ , se ve que cómo el error estándar, EE, es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del tamaño de la muestra,  $n$ , entonces se deduce que es necesario tomar un número muy grande de muestras, incluso para una pequeña mejoría en la precisión, pero el tiempo y el costo involucrados rara vez se justifican en una planta de cría masiva. De hecho, la evidencia sugiere que un aumento en el número de pupas o individuos en una muestra puede ser más efectiva para reducir la variabilidad entre muestras que incrementar el número de muestras tomadas, como se encontró para *Anastrepha obliqua* y *A. ludens* en la planta Moscafrut de México.

Es más efectivo tratar de reducir la variabilidad entre muestras siguiendo los Procedimientos Operativos Estándar de la planta de cría, así como desarrollar y cumplir un plan de muestreo apropiado. La calidad constante de los insectos producirá estimaciones más uniformes a partir de menos muestras. Con base en lo anterior, se recomienda que cada planta determine su propio tamaño de muestreo, lo cual proporciona una precisión aceptable para el menor número de muestras a procesar en función de sus propios datos.

## 2.2. Pruebas de Control de Calidad después de Cría Masiva (pre-irradiación)

### 2.2.1. Peso de Pupa

#### Objetivo

Obtener una estimación precisa de la media del peso de un grupo de pupas midiendo el peso de una muestra.

#### Discusión

El peso es uno de los primeros indicadores de la estabilidad y consistencia de un sistema de cría masiva; es un valioso indicador de la viabilidad general de las pupas y se correlaciona con el tamaño de las moscas adultas obtenidas. La evidencia muestra que los machos estériles más grandes serán, en general, voladores más fuertes, vivirán más tiempo, tendrán una mayor propensión a la cópula y producirán períodos refractarios más largos en las hembras silvestres que los machos pequeños. Los valores del peso medio de la pupa variarán según la cepa y el sistema de cría, por lo que el uso del peso para comparar la calidad general de las pupas de diferentes plantas debe hacerse con precaución. Esta evaluación debe realizarse en la planta de cría masiva y debe repetirse a la llegada al centro de emergencia y liberación de moscas para su confirmación.

Debido a su practicidad, la mayoría de las plantas han adoptado el peso de pupa como una medida del tamaño para el control de calidad del producto. Se recomienda que la evaluación del peso de la pupa sea la prueba de rutina requerida para el tamaño del producto, y que el diámetro de la pupa sea una prueba auxiliar cuando corresponda. El procedimiento para evaluar el diámetro de la pupa se describe en la Sección 8.10 Tamaño de la pupa

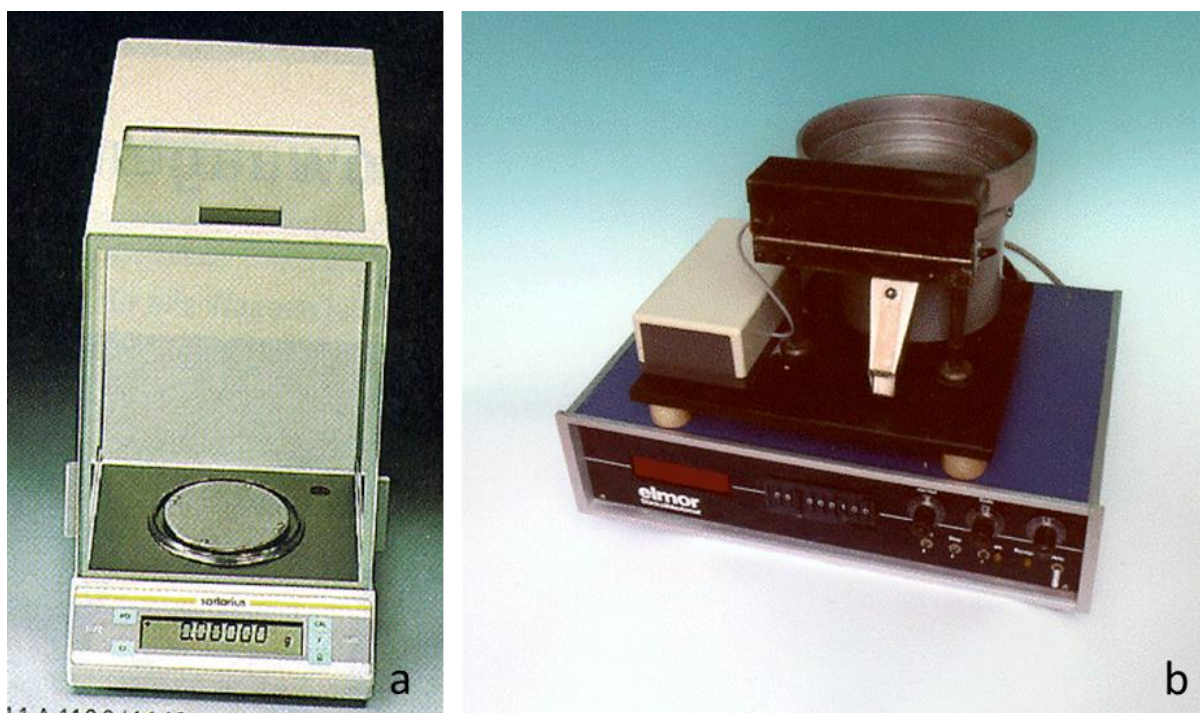
Frecuencia de la prueba: El peso de la pupa, se evalúa fácil y rápidamente, y proporciona una medida robusta de la calidad de la pupa. Se correlaciona bien con otros parámetros de calidad y puede ser un predictor para las pruebas que se realizarán más tarde. Debido a esto, se debe llevar de forma rutinaria para cada lote de irradiación o envío.

#### Equipo

- Balanza o escala con precisión de  $\pm 1$  mg o mejor (**Figura 2.1a**).
- Pinzas blandas para manipular pupas y remover basura de las muestras.
- Tablero con crestas o surcos, u otro dispositivo para simplificar el proceso de contar pupas (opcional).
- Contador de semillas manual u óptico (opcional). Se puede usar un contador óptico (**Figura 2.2b**) para contar pupas en esta prueba, pero se debe calibrar para garantizar la precisión.

#### Condiciones de la prueba

- Temperatura  $25 \pm 1$  °C
- Humedad  $65 \pm 15\%$  RH



**Figura 2.1** (a) Una balanza típica utilizada para pesar pupas; (b) Contador automatizado para contar pupas en muestras.

### Procedimiento

El peso medio de las pupas se determina tomando las muestras pocas horas antes de la irradiación y pesando varios lotes de 100 pupas (como en el caso de *B. tryoni*). De manera alterna, las muestras volumétricas de pupa (e.g., 2 ml para *C. capitata* o 7 ml para *A. ludens* y *A. obliqua*) pueden ser pesadas y después contadas. La edad en el muestreo es crítica porque las pupas pierden agua (y, por lo tanto, peso) a medida que envejecen; de ahí el requisito de realizar esta prueba a una edad determinada cada vez. El número de lotes que deben pesarse dependerá del nivel de precisión deseado en la medición y la cantidad de variación de peso de lote a lote (consulte la Sección 2.1 sobre muestreo). El error estándar asociado al peso medio de las pupas individuales deben ser  $\approx 0.05$  mg (95% C.I. de  $\approx 0.1$  mg) para asegurar estimaciones precisas del número de moscas liberadas. La variación de lote a lote dependerá del método de recolección de larvas, la consistencia de los procedimientos de cría y el método de muestreo de pupas para esta prueba.

*Nota:* se debe tener cuidado al contar las pupas (sugerencia: cuente cada lote dos veces y asegúrese de que los recuentos concuerden); un recuento incorrecto de  $\pm 1$  pupa producirá un error de casi  $\pm 0.1$  mg en el peso medio de la pupa para ese lote.

Se proporciona un formulario de muestreo para registrar los pesos de pupas en 9.1 Formulario de evaluación de peso de pupa. Las especificaciones para el peso de pupa medio de las moscas producidas para los programas TIE se enumeran en el **Cuadro 2.1**.

**Cuadro 2.1** Especificaciones para el peso medio de pupas de moscas tefrítidas producidas para programas TIE.

Especies	Peso de pupa (mg)	
	Mínimo	Media aceptable
<i>Ceratitis capitata</i>		
Cepa de sexado genético (tsl)	7.00	7.80
<i>Anastrepha ludens</i>	17.08	17.71
<i>Anastrepha obliqua</i>	13.52	14.22
<i>Anastrepha suspensa</i>	10.00	14.00
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	13.00	13.50
<i>Bactrocera dorsalis</i>	12.30	12.90
<i>Bactrocera oleae</i>	6.00	6.54
<i>Bactrocera tryoni</i>	8.50	10.00

### Interpretación

Las tendencias a la baja en el peso medio de las pupas en una planta pueden ser resultado de una nutrición deficiente, hacinamiento en la etapa larvaria, altas temperaturas y contaminación en la dieta, condiciones inadecuadas durante la maduración de la pupa (e.g., desecación) u otros factores que pueden reducir la viabilidad de los insectos liberados. Dado que un tamaño por debajo del umbral crítico (peso mínimo de pupa) es probable que vaya acompañado de un bajo desempeño en otros índices de calidad y en el campo, esto debe evitarse mediante el uso de procedimientos estándares de cría específicos para cada especie.

### 2.2.2. Emergencia y Habilidad de Vuelo

#### Objetivo

Obtener una estimación precisa del porcentaje de adultos que emergerán y porcentaje de adultos que son capaces de volar.

#### Discusión

Las moscas estériles deben ser capaces de dispersarse desde el punto de liberación para localizar refugio, comida y agua, y más importante, apareamientos. Si ellas son incapaces de volar entonces no serán útiles en un programa TIE.

Una estimación precisa del número de voladoras en un lote de pupas estériles en un centro de emergencia y liberación de moscas, ayuda a planificar las liberaciones para lograr una relación de estéril:fértil adecuada. La prueba se realiza rutinariamente en pupas antes y después de la irradiación, y nuevamente después del envío para programas con centros de liberación de moscas.

La prueba consiste en colocar pupas en un tubo y calcular el número de voladoras de lo que queda en el tubo en un tiempo determinado después de que los adultos hayan salido. El conteo de lo que queda en los tubos proporciona información sobre cuánta mosca emergió, cuantas emergieron parcialmente, cuantas son deformes o están completamente emergidas pero no son voladoras. Esta información es útil para evaluar y corregir problemas en cría, edad de irradiación, manejo y envío.

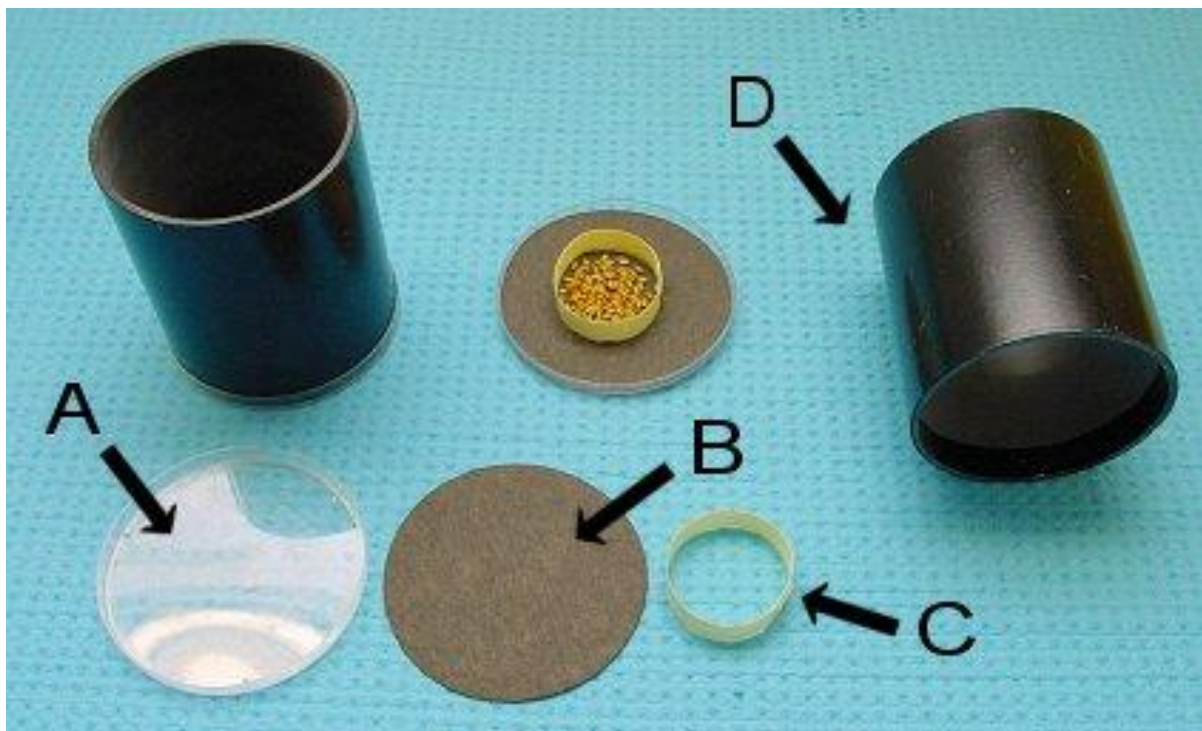


La prueba se ha refinado varias veces desde que se diseñó por primera vez y ahora requiere que las moscas escapen de los tubos sin ayuda, en lugar de ser atraídas.

Ahora se utiliza un procedimiento diferente para evaluar la capacidad de vuelo de las moscas estériles después del enfriamiento (ver sección 6.3.1) y después de la liberación (ver sección 6.4.1). Para esas etapas, la prueba se llama voladoras absolutas, ya que utiliza a los adultos como punto de partida

### Equipo

- Tubos de Plexiglas: de diámetro exterior de 8,9 cm con pared de 3 mm de espesor; pintada de negro (o de plexiglás negro opaco) para que la luz entre solo en la parte superior; 10 cm de alto. (**Figura 2.2**). El plexiglás se ha elegido sobre cartón o vidrio porque es irrompible y se puede lavar y reutilizar indefinidamente. Se debe tener cuidado de no rayar el interior de los tubos mientras se limpian. Evite usar un limpiador abrasivo.
- Las tapas de las cajas de Petri, de 90-100 mm de diámetro, deben pintarse de negro o la parte inferior superpuesta con papel negro (como papel filtro negro).
- Tira de papel poroso (como papel secante u otro similar), de 1 cm de ancho, y formando un anillo de 6 cm de diámetro.
- Equipo diverso: talco en polvo sin perfume, contador de mano, pinzas blandas y espátula de micro-cuchara.
- Habitación / cámara con un ambiente controlado.



**Figura 2.2** Equipo para la prueba de emergencia y habilidad de vuelo.

### Condiciones de prueba

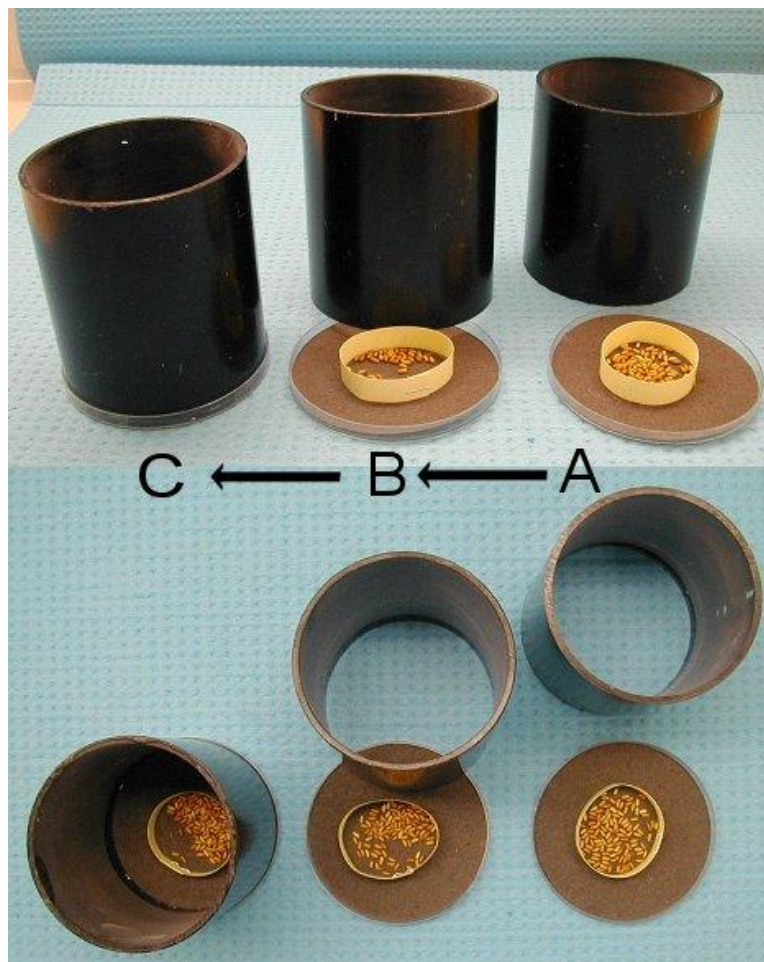
- Temperatura  $25 \pm 1^\circ \text{C}$
- Humedad  $65 \pm 15\% \text{ HR}$
- Intensidad de luz 1,500 lux (parte superior de los tubos)

- Fotoperiodo 14 horas luz:10 horas oscuridad

Frecuencia de la prueba: La emergencia y habilidad de vuelo se evalúan para cada lote de irradiación o envío.

### Procedimiento

Dos días antes de la emergencia, se colocan 100 pupas dentro del anillo de papel, el cual se coloca centrado en el fondo de la caja de Petri. Antes de cada uso, el interior de cada tubo se cubre ligeramente con polvo de talco sin olor para prevenir que las moscas salgan caminando. Los tubos se golpean ligeramente con una superficie sólida para eliminar el exceso de talco, y éste se elimina del fondo de la parte interna del tubo 1 cm (*Ceratitis* y *Bactrocera*) o 3 cm (*Anastrepha*) para proveer superficie de reposo donde las moscas recién emergidas desplieguen sus alas. La limpieza debe realizarse con un dedo enguantado o un paño para evitar la introducción de humedad o aceite en el tubo. El tubo de plexiglás con talco se coloca en la tapa oscura de la caja de Petri. Se realizan cinco réplicas (cinco tubos con 100 pupas cada uno) para cada lote. El montaje de la prueba se muestra en la **Figura 2.3**.



**Figura 2.3** Configuración de la prueba de emergencia y habilidad de vuelo.

Las moscas que emergieron y volaron deben removerse de la vecindad de los tubos para eliminar su retorno a los tubos. Hay varias formas de lograr esto:

- Los tubos se colocan en una arena de Plexiglas ventilada (e.g., una jaula de 30 x 40 x 30 cm), y todas las moscas que hayan escapado del tubo se aspiran de la jaula una o dos veces al día.
- Se permite que las moscas emerjan y vuelen libremente en una habitación pequeña o en una jaula grande (al interior), y se utilizan trampas adhesivas o trampas de electrocución con luz negra para eliminar las moscas voladoras.
- Los tubos se “tapan” con una tapa de caja de Petri tan pronto sea obvio que la emergencia se ha completado, o el día en que se libere el lote. Este es el procedimiento más apropiado cuando la prueba se realiza en el centro de emergencia y liberación de moscas.

Estos u otros métodos pueden funcionar siempre y cuando se cumplan las condiciones de la prueba y se demuestre que el retorno de las moscas a los tubos de habilidad de vuelo es mínimo. Los tubos de vuelo "simulados" (sin pupas, pero similares en todo lo demás) pueden usarse periódicamente para estimar la incidencia de retorno. No se debe usar comida y / o agua para atraer a las moscas fuera de los tubos.

**Cuadro 2.2** Especificaciones para porcentajes de pupas que producen moscas adultas (emergencia) y moscas capaces de volar (habilidad de vuelo) de moscas tefrítidas producidas para programas SIT.

Especies/cepa	Mínimo			Media aceptable		
	Pre-irradiación	Post-irradiación	Post-envío	Pre-irradiación	Post-irradiación	Post-envío
Emergencia (%)						
<i>Ceratitis capitata</i>						
Cepa sexada genéticamente (tsl)	75	70	70	80	75	70
<i>Anastrepha ludens</i>	91	90	80	93	92	86
<i>Anastrepha obliqua</i>	92	90	86	94	92	89
<i>Anastrepha suspensa</i>	85	80	75	93	90	88
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	90	80	70	92	90	85
<i>Bactrocera dorsalis</i>	82	74	70	90	79	75
<i>Bactrocera oleae</i>	80	75	55	85	80	60
<i>Bactrocera tryoni</i>	80	70	65	85	80	75

Especies/cepas	Mínimo			Media aceptable		
	Pre-irradiación	Post-irradiación	Post-Envío	Pre-irradiación	Post-irradiación	Post - envío
Voladoras (%)						
<i>Ceratitis capitata</i>						
Cepa sexada genéticamente (tsl)	70	65	65	75	70	65
<i>Anastrepha ludens</i>	88	86	71	90	89	79
<i>Anastrepha obliqua</i>	89	85	77	90	88	80
<i>Anastrepha suspensa</i>	75	70	65	85	80	75
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	80	75	-	85	83	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	75	69	62	83	77	72
<i>Bactrocera oleae</i>	70	65	50	77	72	55
<i>Bactrocera tryoni</i>	70	65	60	75	70	65

Después de que las moscas salieron volando de los tubos o murieron, se cuenta el contenido (moscas y pupas no emergidas). El porcentaje de emergencia y el de habilidad de vuelo se calculan según las fórmulas en 9.2. Las especificaciones de emergencia y de habilidad de vuelo de las especies de moscas evaluadas antes y después de la irradiación y al arribo al centro de emergencia y liberación se detallan en el **Cuadro 2.2**.

### **Interpretación**

Los dos parámetros más importantes son el porcentaje de emergencia y el porcentaje de voladoras. La información adicional (moscas parcialmente emergidas, deformadas, tasa de voladoras), pueden ser útiles para el personal de cría. Los análisis comparativos entre los datos generados en la planta de producción y en los centros de emergencia y liberación se deben realizar semanalmente. Un alto grado de variabilidad o una tendencia descendente en los datos pueden indicar un problema que requiere medidas correctivas en la cría, manejo, envío o materiales.

### **2.2.3. Supervivencia bajo Estrés**

#### **Objetivo**

Esta prueba es una medida relativa de las reservas disponibles para la mosca adulta en diferentes períodos críticos: en la emergencia, después del manejo / enfriamiento y después de la liberación.

#### **Discusión**

La capacidad de las moscas para sobrevivir bajo estrés, sin comida ni agua, es importante en un programa TIE porque los insectos estériles liberados deben sobrevivir el tiempo suficiente para madurar sexualmente y buscar parejas. Algunas instalaciones evalúan la supervivencia de las moscas individualmente en celdas pequeñas y reportan una mejor supervivencia que cuando la prueba se realiza con moscas en una caja de Petri como se describe en el procedimiento. Sin embargo, la capacidad de sobrevivir al estrés causado por el hacinamiento en los contenedores de pre-liberación es importante; por lo tanto, la prueba estándar requiere que las moscas se prueben en cajas de Petri.

Esta prueba se realiza en la planta de cría con moscas no irradiadas. Con fines comparativos, las moscas también se prueban después de la irradiación, y otras tres veces más en los centros de emergencia y liberación de la mosca: al arribo, después del manejo / enfriamiento y posterior a la liberación.

#### **Equipo**

- Cajas de Petri grandes (150 mm de diámetro) con una abertura de aproximadamente 100 mm en el centro de la tapa que está cubierta con una malla fina (malla de 36 cuadrados / cm<sup>2</sup>) para ventilación. Un orificio con una mecha de algodón o un tapón pequeño en el costado de la caja de Petri permitirá que se retiren las moscas muertas.
- Aspirador o bomba de succión.
- Espacio controlado ambientalmente, sin luz.
- Jaula de emergencia que permita un acceso fácil para remover las moscas.

### Condiciones de prueba

- Temperatura 25 ± 1° C
- Humedad 60-70% HR
- Luz en oscuridad

### Frecuencia de la prueba

Esta es una prueba que requiere de 4 a 5 días para completarla. Puede ser apropiado realizarla una vez a la semana o una vez cada quince días. La sobrevivencia está relacionada con el peso de la pupa, por lo que se puede obtener una indicación más temprana de la sobrevivencia potencial a través de la prueba del peso de la pupa.

### Procedimiento

Se coloca una muestra de varios miles de pupas en una jaula de emergencia sin agua ni alimento. Dentro de las dos horas posteriores a la emergencia, 50 machos y 50 hembras (o 100 moscas de un lote de producción si se usa una cepa de sexado genético) se transfieren usando un aspirador, o preferiblemente una bomba de succión, a cada una de las cinco cajas de Petri sin agua ni alimento. Las cajas se dejan en oscuridad hasta el fin de la prueba, cuya duración varía con la especie (ver **Cuadro 2.3**). Después del tiempo preestablecido, las moscas muertas se eliminan inclinando la caja Petri y retirando el tapón, teniendo cuidado de que las moscas vivas no escapen. Tanto las moscas muertas como las vivas se registran por sexo. Los resultados se expresan como porcentaje de sobrevivencia. Una hoja de registro se encuentra en 9.3 Formulario de evaluación de supervivencia bajo estrés.

Se sigue un procedimiento similar cuando las pupas llegan al centro de emergencia y liberación (ver Sección 5.2.3). Cuando la prueba se realiza después del manejo / enfriamiento y post liberación, para ello se recogen muestras de moscas después del proceso de enfriamiento y de las bolsas o cajas de liberación.

**Cuadro 2.3** Especificaciones para sobrevivencia bajo prueba de esfuerzo de moscas tefritidas producidas para programas TIE.

Especies	Duración de la prueba (h)	Sobrevivencia mínima (%)
<i>Ceratitis capitata</i>		
Cepa sexada genéticamente (tsl)	48	65
<i>Anastrepha ludens</i>	72	55
<i>Anastrepha obliqua</i>	48	40
<i>Anastrepha suspensa</i>	48	n/a
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	n/a	n/a
<i>Bactrocera dorsalis</i>	n/a	n/a
<i>Bactrocera oleae</i>	n/a	n/a
<i>Bactrocera tryoni</i>	n/a	n/a

(n/a): sin datos disponibles en este momento, se solicita a los lectores enviar datos para su inclusión en futuras revisiones.

### Interpretación

Los resultados de la prueba de estrés son generalmente interpretados como una medida relativa de las reservas alimenticias y de agua en los adultos criados masivamente. Esta medición es un indicador de los elementos generales asociados con el proceso de cría de larvas, contenido nutricional de la dieta, densidad de larvas por gramo de dieta en la charola

de larvas, controles ambientales y otros factores que pueden afectar la capacidad del insecto para almacenar reservas de grasa a través de las etapas larval y pupal y así sostener la mosca adulta. Además, cuando se aplica en las etapas posteriores al manejo / enfriamiento y post-liberación, permite hacer una evaluación de las reservas tomadas por la mosca durante la alimentación en el centro de emergencia y liberación de moscas. Valores más bajos que los estándares listados en el **Cuadro 2.3** pueden indicar problemas en este proceso.

## 2.3. Pruebas de Control de Calidad Post-irradiación

### 2.3.1. Indicador de Irradiación

Para garantizar que la irradiación se haya realizado correctamente, se debe colocar un indicador (etiqueta) de radiación del rango adecuado para la dosis que se administra en cada bolsa o contenedor de pupas antes de la irradiación. Este indicador debe verificarse inmediatamente al retirar el material del irradiador. El color del indicador cambiará de rojo a negro cuando se haya aplicado la dosis especificada (**Figura 2.4**).



**Figura 2.4** Indicadores sensibles a la radiación antes (arriba) y después (abajo) de la exposición a dosis > 125Gy (© ISP 2002).

### 2.3.2. Emergencia y Habilidad de Vuelo

Esta prueba se repite en muestras de pupas después de la irradiación para evaluar el efecto de la irradiación. El procedimiento es el mismo que en la Sección 2.2.2. Los valores estándar aceptables para la emergencia y habilidad de vuelo están en el **Cuadro 2.2**.

### 2.3.3. Sobrevivencia bajo Estrés

Esta prueba es la misma que la descrita en la Sección 2.2.3, usando pupas que han sido irradiadas.

### 2.3.4. Proporción Sexual y Tiempo de Emergencia

#### Objetivo

Determinar la proporción de machos y hembras dentro de un lote de moscas criadas masivamente. El tiempo de emergencia se usa para medir la uniformidad de la edad dentro de un lote de pupas.

## **Discusión**

Una desviación significativa de la proporción sexual en colonia puede ser una indicación rápida de problemas en cría. Estos problemas pueden ser de naturaleza genética o derivarse de efectos de procedimientos, o condiciones inadecuadas de confinamiento de pupas. El monitoreo de la proporción sexual es especialmente crítico cuando se trata de cepas de sexado genético porque ésta cambia con la recombinación.

## **Equipo**

- Rejillas de emergencia con 100 celdas individuales cubiertas por una pantalla. Estas rejillas se construyen a partir de rejillas de plástico abiertas que a menudo se usan debajo de tubos fluorescentes o de luz LED. Las cuadrículas tienen 1 cm de altura y las celdas, abiertas arriba y abajo, son de 1,5 cm cuadrados. Las cuadrículas se cortan en secciones de 10 celdas por 10 celdas (15 x 15 cm), y la pantalla se pega a un lado. Para moscas más grandes como *Anastrepha* spp., las celdas de la cuadrícula miden 1.8 x 1.8 cm (18 x 18 cm). Se usa una lámina de plexiglás cortada a medida para cubrir el lado abierto de la rejilla y se mantiene en su lugar con una banda elástica.
- Contador manual.
- Pinzas suaves.

## **Condiciones de prueba**

Las condiciones de mantenimiento de las rejillas (temperatura, humedad, intensidad de luz y fotoperíodo) deben ser similares a las utilizadas en el centro de emergencia y liberación de moscas.

## **Frecuencia de la prueba**

Esta prueba se debe desarroolar para cada envío, o al menos una vez a la semana, para asegurar que las pupas se irradiaron a la edad apropiada.

## **Procedimientos**

Para las plantas de cría esta prueba se inicia en el momento de la irradiación; para los centros de emergencia y liberación, la prueba se inicia cuando se rompe la hipoxia. Para la prueba se coloca una pupa en cada celda y la rejilla se cubre con la lámina de plexiglás. Las rejillas se examinan dos veces al día con intervalos de 8 horas, de preferencia temprano en la mañana y en la tarde. Controles más frecuentes son una opción y proporcionarían una estimación más precisa del momento de la emergencia. Los tiempos de control deben ser constantes cada día. En cada verificación, se cuenta el número de machos y hembras emergidos. Al no presentarse más emergencias la prueba finaliza.

Los resultados de la proporción sexual se expresan como porcentaje de machos. Los resultados del tiempo de la emergencia se grafican por sexo según el número de moscas emergidas en el tiempo (normalmente un período de 72 horas). Una hoja de registro se muestra en la sección 9.4 Formulario de evaluación de la proporción sexual y el tiempo de emergencia.

## **Interpretación**

El porcentaje de machos en lotes de producción debe estar dentro del rango de 45-55% para las cepas bisexuales. La producción de cepas de sexado genético de la mosca del Mediterráneo *ts/* debe ser superior al 99% de machos o superior al 95% de machos para otras

cepas de sexado genético basadas en dimorfismos de color pupal. La proporción sexual que se desvíe más allá de los estándares establecidos puede indicar problemas genéticos o de proceso y se debería iniciar una revisión de cada componente de la producción masiva. Algunos procesos de producción pueden tender a sesgar las proporciones de sexos, y esto debe tenerse en cuenta.

La emergencia debe ocurrir entre las 24 y 72 horas de irradiación o la ruptura de la hipoxia, con un pico agudo de emergencia cerca de las 48 horas. Cualquier desviación significativa de este intervalo indica que el momento de la irradiación no fue óptimo. El momento óptimo para la irradiación de pupas se determina observando el color de los ojos como una indicación de la edad fisiológica (ver Sección 3.1 Etapa de desarrollo / edad de los insectos). La presencia de más de un pico de emergencia distinto cuando se grafica indica que no es uniforme la edad del lote de pupas.

## 2.4. Literatura Relevante

**Annual book of ASTM standards**, Vol. 12.02 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. USA.

**Bloem, K., S. Bloem, D. Chambers and E. Muñiz. 1993.** Field evaluation of quality: release-recapture of sterile medflies of different sizes. 295-296. *In* Aluja, M and P. Liedo [eds.] *Fruit flies: biology and management*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.

**Boller, E.F. and D.L. Chambers. 1977.** Quality control: an idea book for fruit fly workers. IOBC/WPRS Bull. 1977/5. 162 p.

**Boller, E.F., B.I. Katsoyannos, U. Remund and D.L. Chambers. 1981.** Measuring, monitoring, and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* Wied. 1. The RAPID quality control system for early warning. *Z. angew. Entomol.* 92: 67-83.

**Brazzel, J.R., C. Calkins, D.L. Chambers and D.B. Gates. 1986.** Required quality control tests, quality specifications, and shipping procedures for laboratory produced Mediterranean fruit flies for sterile insect control programs. APHIS 81-51, USDA-APHIS, Hyattsville, MD.

**Burk, T. and J.C. Webb. 1983.** Effect of male size on calling propensity, song parameters, and mating success in Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 678.

**Caceres 2002** Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Genetica* 116: 107-116.

**Calkins, C.O., and T.R. Ashley. 1989.** The impact of poor quality mass-reared Mediterranean fruit flies on the sterile insect technique used for eradication. *J. Appl. Ent.*, 108:401-408.

**Calkins, C.O., T.R. Ashley and D.L. Chambers. 1996.** Implementation of technical and managerial systems for quality control in Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) sterile release programs. 399-404. *In* McPherson, B.A., and G.C. Steck [eds.], *Fruit fly pests: a world assessment of their biology and management*. St. Lucie Press, Delray Beach, Florida, USA.

**Calkins, C.O., K. Bloem, S. Bloem and D.L. Chambers. 1994.** Advances in measuring quality and assuring good field performance in mass reared fruit flies. 85-96. *In* Calkins, C.O., W. Klassen, and P. Liedo [eds.], *Fruit Flies and the Sterile Insect Technique*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

**Calkins, C.O., E.F. Boller, D.L. Chambers and Y. Ito. 1979.** Quality control in *Ceratitis capitata*: a training manual for the international course on quality control held in Castellon, Spain, 17-27 September, 1979.



- Calkins, C.O. and A.G. Parker. 2005.** Sterile Insect Quality. 269-296. *In* Dyck, V.A., J. Hendrichs, and A.S. Robinson [eds.]. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Chambers, D.L. 1980.** Review SIRM with special reference to quality control. 1-5. *In* Proceedings of a Symposium on Fruit Fly Problems. Kyoto & Naha, Japan. August 9-12, 1980. National Institute of Agricultural Services. Yatabe, Ibaraki, Japan.
- Chambers, D.L., C.O. Calkins, E.F. Boller, Y. Ito and R.T. Cunningham. 1983.** Measuring, monitoring, and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* Wied. 2. Field tests for confirming and extending laboratory results. *Z. angew. Entomol.* 95: 285-303.
- Churchill-Stanland, C., R. Stanland, T.T.Y. Wong, N. Tanaka, D.O. McInnis and R.V. Dowell. 1986.** Size as a factor in the mating propensity of Mediterranean fruit flies, (*Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae), in the laboratory. *J. Econ. Entomol.* 79: 614-619.
- Collins, S.R. and P.W. Taylor 2010.** Flight ability procedures for mass-reared Queensland fruit flies, *Bactrocera tryoni*: an assessment of some variations. *Ent. exp. appl.* 136: 308-311.
- Fanson, B.G., S. Sundaralingam, L. Jiang, B.C. Dominiak and G. D'Arcy. 2014.** A review of 16 years of quality control parameters at a mass-rearing facility producing Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*. *Entomol. Exp. Appl.* 151: 152-159.
- Gilchrist A.S., E.C. Cameron, J.A. Sved, and A.W. Meats. 2012.** Genetic consequences of domestication and mass rearing of pest fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 105: 1051-1056.
- Hernández, E., S. Flores Breceda, M.L. Sosa Iturbe and H. Ezquivel 2005.** Tamaño de unidad muestral y número de repeticiones para la estimación de los parámetros de desarrollo de *Anastrepha obliqua* y *A. ludens* (Diptera: Tephritidae). *Folia Entomol. Mex.*, 44: 155-164.
- Klee, A. 1981.** International meeting on *Ceratitidis capitata* quality control. Guatemala, October, 1981.
- Krainacker, D.A., J.R. Carey and R.I. Vargas. 1989.** Size-specific survival and fecundity for laboratory strains of two tephritid (Diptera: Tephritidae) species: implications for mass rearing. *J. Econ. Entomol.* 82: 104.
- Leppla, N.C. 2009** The basics of quality control for insect rearing. 289-306. *In* J.C. Schneider [ed.]. *Principles and Procedures for Rearing High Quality Insects*. Mississippi State University.
- Orozco, D. and R.O. Lopez. 1993.** Mating competitiveness of wild and laboratory mass-reared medflies: effect of male size. 185-188. *In* Aluja, M., and P. Liedo [eds.], *Fruit flies: biology and management*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Orozco, D.O., A.G. Schwarz and A. Perez Romero. 1983.** Manual de procedimientos de control de calidad. Dirección General de Sanidad Vegetal, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Talleres Graficos de Nacion. Mexico, D.F. p 137.
- Ruhm, M.E. and C.O. Calkins. 1981.** Eye-color changes in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* pupae, a technique to determine pupal development. *Entomol. Exp. Appl.* 29: 237-240.
- Rull J., A. Birke, R. Ortega, P. Montoya and L. López 2012.** Quantity and safety vs. quality and performance: conflicting interests during mass rearing and transport affect the efficiency of sterile insect technique programs. *Entomol. Exp. Appl.* 142: 78-86.
- Southwood, T.R.E. and P.A. Henderson 2000.** *Ecological methods* (3rd Ed.). Blackwell Science, Oxford, UK.
- Vera, T., S. Abraham, A. Oviedo and E. Willink 2007.** Demographic and quality control parameters of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) maintained under artificial rearing. *Fla. Entomol.* 90: 53-57.

**Wajnberg, E. 2003.** Basic statistical methods for quality control workers. 305-314 *In* J.C. van Lenteren [ed.] *Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures.* CABI Publishing, Cambridge, MA, USA.

**Weldon C.W., J. Prenter and P.W. Taylor. 2010.** Activity patterns of Queensland fruit flies (*Bactrocera tryoni*) are affected by both mass-rearing and sterilization. *Physiol. Entomol.* 35: 148-153.

### **3. Irradiación**

#### **3.1. Estado de Desarrollo / Edad de los Insectos**

##### **Objetivo**

Determinar el tiempo de irradiación para favorecer una liberación de machos estériles de buena calidad y con un desempeño sexual aceptable.

##### **Discusión**

La aplicación de la TIE en moscas de la fruta implica la irradiación durante un período de tiempo estrecho en la etapa imaginal temprana de la pupa tardía para inhibir la reproducción pero sin afectar la capacidad sexual, para liberar machos estériles en el área objetivo que compitan sexualmente con sus contrapartes silvestres. Esos insectos deben irradiarse a una edad específica para maximizar la inducción de la esterilidad y minimizar los efectos negativos sobre su calidad y competitividad sexual. Estos datos pueden usarse en las plantas de cría masiva para gestionar las condiciones de mantenimiento de pupas y también como indicadores para optimizar el momento de la irradiación.

##### **Equipo**

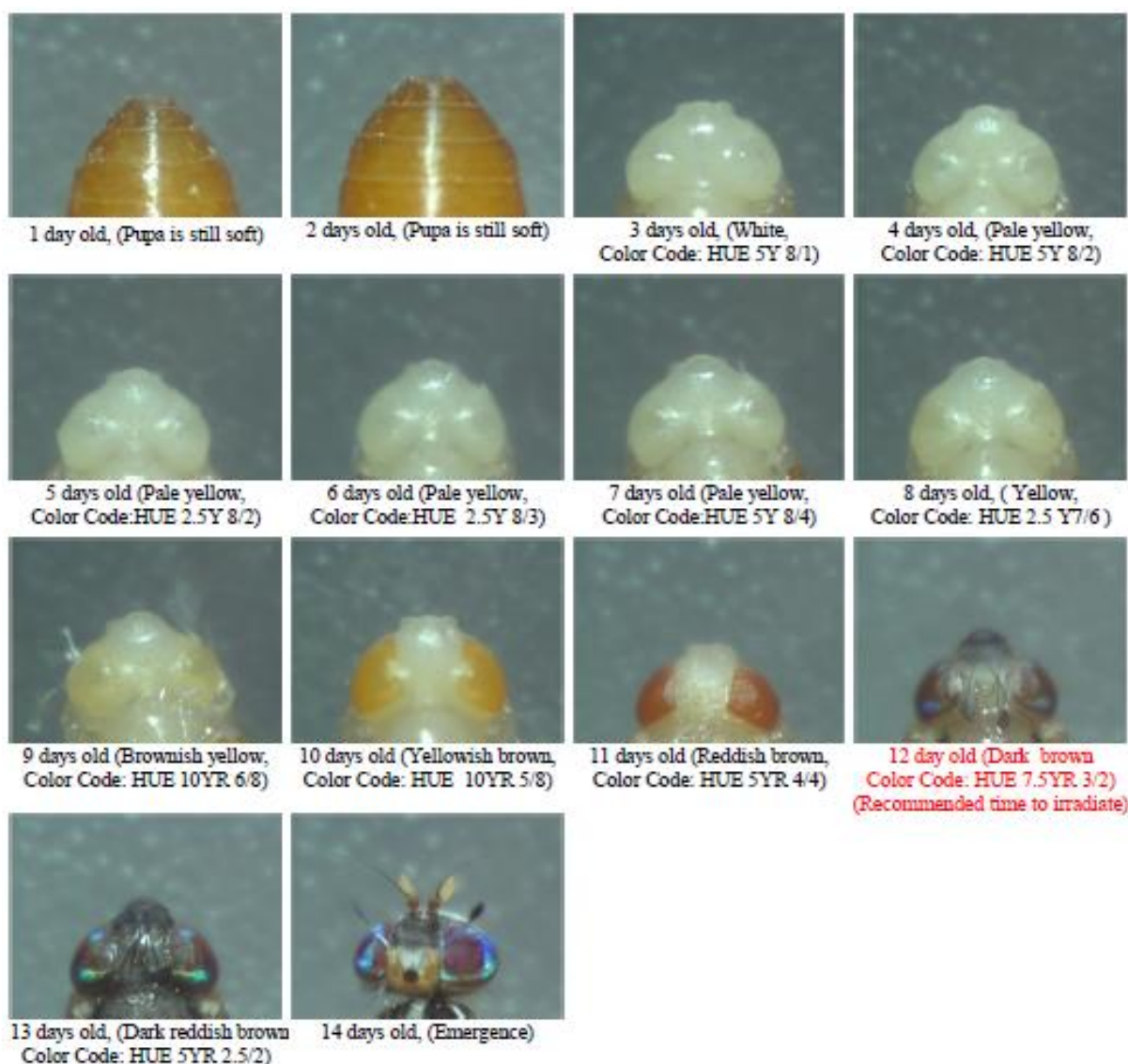
- Equipo de irradiación
- Estereomicroscopio
- Gráficos Munsell de color del suelo
- Instrumentos de disección

##### **Procedimiento**

Se disecta una muestras de 10 pupas por lote por día para observar cambios en el color de ojos del imago. La cubierta de la parte anterior del puparium se retira con cuidado para exponer los ojos del imago en desarrollo. Los datos diarios del color de los ojos se registran, se tabulan y se comparan con la escala de colores de los Gráficos de colores del suelo de Munsell.

##### **Interpretación**

La progresión de los cambios en el color de los ojos de la pupa en cada especie se puede usar como referencia en las plantas de cría masiva para cronometrar el tiempo de irradiación de las pupas bajo condiciones de temperaturas controladas, y también para regular el desarrollo de las pupas según las necesidades del programa TIE. Como ejemplo, se presenta el desarrollo del color de ojos en machos *Ceratitis capitata* (cepa de sexado genético VIENNA-8) a 20 ° C en la **Figura 3.1**. El tiempo de desarrollo de la pupa en días hasta la emergencia de adultos de varias especies y cepas de moscas de la fruta a diferentes temperaturas se presenta en el **Cuadro 3.1**.



**Figura 3.1** Ejemplo del cambio de color de ojos dentro del puparium antes de la emergencia de adultos de *Ceratitis capitata* (cepa de sexo genético VIENNA-8) a 20 °C. Para la denominación del color y el código, consulte las Cartas de color del suelo de Munsell (Anónimo, 2000).

## 3.2. Procedimientos Pre-irradiation

### Marcado de insectos

Para los programas TIE (incluidos todos los que se ejecutan en áreas donde la plaga objetivo no se considera bien establecida), las pupas se marcan con polvo fluorescente antes de la irradiación. Esto se hace girando suavemente las pupas en un tambor u otro recipiente grande con polvo Day-Glo® (1,5 g de polvo por litro de pupas, en el caso de *C. capitata*) hasta que las pupas estén cubiertas uniformemente con el polvo.

**Cuadro 3.1** Tiempo de desarrollo de la pupa (d) hasta la emergencia de adultos de varias especies y cepas de moscas de la fruta a diferentes temperaturas.

Especies	Temperatura de mantenimiento de pupas (°C)					
	15	17	20	26	28	20–35 <sup>3</sup>
<i>Anastrepha fraterculus</i> (ARG)	57	25	22	14	13	21
<i>Anastrepha ludens</i>	49	-	33 <sup>1</sup>	16	15	16
<i>Anastrepha obliqua</i>	40	-	31 <sup>1</sup>	14	12	14
<i>Anastrepha serpentina</i>	49	-	31 <sup>1</sup>	16	14	15
<i>Zeugodacus cucurbitae</i> (cepa bisexual)	45	17	15	10	9	11
<i>Zeugodacus cucurbitae</i> (wp-GSS MAR)	-	-	21 <sup>1</sup>	11 <sup>2</sup>	9	10
<i>Zeugodacus cucurbitae</i> (wp-GSS)	-	19	15	9	8	12
<i>Bactrocera dorsalis</i> (cepa bisexual)	-	19	16	10	9	12
<i>Bactrocera dorsalis</i> (wp-GSS)	-	19	16	10	9	16
<i>Bactrocera dorsalis</i> (Población africana)	-	21	16	11	9	13
<i>Bactrocera oleae</i>	44	19	15	11	10	17
<i>Bactrocera tryoni</i>	-	-	18	11	9	13
<i>Bactrocera zonata</i>	-	-	21 <sup>1</sup>	11 <sup>2</sup>	9	10
<i>Ceratitidis capitata</i> (cepa bisexual)	-	17	16	10	9	11
<i>Ceratitidis capitata</i> (VIENNA-8)	-	17	14	9	8	15
<i>Ceratitidis capitata</i> (VIENNA-8 SAF)	29	-	18 <sup>1</sup>	11 <sup>2</sup>	9	-

<sup>1</sup>19°C, <sup>2</sup>25°C, <sup>3</sup>Ambiente natural (temperatura fluctúa entre 20 y 35°C)

## **Empaque para irradiación**

### **Contenedor:**

El tamaño y la forma del recipiente de envasado son típicamente una función del tamaño y la forma de la cámara en el irradiador.

*Bolsas de polietileno:* Las pupas quedan contenidas dentro de bolsas de polietileno o "salchichas" que tienen un grosor de aproximadamente 1.5 MIL. (MIL es una milésima de pulgada = 0.0254 mm). En algunos casos, las pupas están en doble bolsa (antes de la irradiación) como medida adicional para evitar que las bolsas se rompan.

En el caso de los irradiadores Gammacell (e.g., en El Pino, Guatemala y Arica, Chile), los recipientes aceptan bolsas que contienen un máximo de 2 litros de pupas. En el caso de Cobalt-60 484 (por ejemplo, en El Pino, Guatemala) los botes aceptan bolsas de plástico que contienen un máximo de 20 litros de pupas.

En el caso de los irradiadores Husman (por ejemplo, en las plantas de USDA de la mosca Mexicana, USDA Hawái y El Pino) los recipientes aceptan bolsas plásticas de "salchichas" más grandes que contienen 4 litros de pupas cada una.

### **Hipoxia:**

El uso de atmósferas de oxígeno reducido durante la irradiación de pupas tefritidas, es obligatorio para disminuir la generación de radicales libres por rayos gamma o rayos X que inducen daños colaterales intracelulares durante la irradiación. Esto permite alcanzar mayores niveles de esterilidad sin reducir la calidad y la competitividad de las moscas. Típicamente, las pupas se colocan en recipientes herméticos y se mantienen a temperatura fría (12-20 ° C)

durante al menos 1 hora antes de ser irradiadas. Durante ese período, los insectos agotan la mayor parte del oxígeno dentro del contenedor. Si los recipientes son rígidos (por ejemplo, botellas), deben llenarse hasta su capacidad máxima para minimizar la cantidad de aire disponible. Si se usan bolsas de plástico, deben quedar bien atadas después de sacar el exceso de aire. Un método alternativo para lograr la hipoxia es saturar la atmósfera dentro del recipiente con un sustituto del oxígeno (por ejemplo, N<sub>2</sub>), pero se requieren dosis de radiación mayores para lograr un nivel de esterilidad similar en comparación con las condiciones de hipoxia. Las temperaturas frescas y la hipoxia son necesarias para reducir la tasa metabólica de las pupas durante la irradiación y el envío posterior. La hipoxia sin embargo, no es sin efecto en la calidad de las moscas, y el **Cuadro 3.2** ilustra el efecto de la hipoxia en periodos variables.

**Cuadro 3.2** Datos de emergencia y voladoras de moscas de la fruta expuestas a hipoxia post-irradiación por diferentes períodos de tiempo.

CC Centro/Especies	Duración de hipoxia(h)	Emergencia (%)	Voladoras (%)
Moscas criadas y evaluadas en la Planta de Cría de Moscas de la Fruta del USDA en Hawái			
<i>Ceratitis capitata</i> (sin irradiar)	0	95.6	92.5
	1	94.1	90.3
	10	94.3	89.2
	20	94.1	88.9
	30	94.1	85.8
	45	92.9	82.2
Moscas criadas y evaluadas en la Planta de Cría de Moscas de la Fruta Moscafrut, en México			
<i>Anastrepha ludens</i>	0	93	90
	15	86	81
	25	85	80
	35	84	78
	45	81	74
Moscas criadas y evaluadas en la Planta de Cría de Moscas de la Fruta Moscafrut, en México			
<i>Anastrepha obliqua</i>	0	92	87
	15	89	79
	25	88	78
	35	83	75
	45	79	74
	55	75	66

### Selección de la dosis absorbida

La dosis absorbida por radiación (en adelante dosis) que se usa para inducir esterilidad, es de importancia crítica en los programas TIE. Los métodos para medir la dosis de radiación se dan en el capítulo 4 (Dosimetría). Los insectos que reciben una dosis demasiado baja retienen elevada fertilidad para los fines del programa y podrían comprometer la seguridad cuarentenaria. Una dosis demasiado alta dará como resultado insectos que no compiten bien contra las moscas silvestres en el campo, reduciendo la efectividad del programa TIE. El equilibrio entre esterilidad y calidad es muy importante.

Las dosis que se usan en un programa TIE, se basan en un acuerdo mutuo entre la planta de cría y el usuario final. La decisión se basa en los resultados de la Prueba de esterilidad (sección 7.1) en combinación con consideraciones tales como los requisitos del programa y

los efectos de la dosis de radiación sobre la calidad del insecto. Por lo general, el gerente del programa querrá especificar un rango de dosis óptimo para lograr niveles apropiados de calidad y esterilidad, o una dosis mínima que todas las pupas deben recibir, pero a menudo esto se convierte en una decisión política y se prescribe una dosis más alta. Se puede encontrar información adicional en el Directorio de Plantas TIE (DIR-SIT, <http://nucleus.iaea.org/sites/naipc/dirsit/SitePages/Home.aspx>) para las dosis actuales usadas.

En la mayoría de las moscas tefrítidas, la dosis requerida para detener la producción de huevos en las hembras, es típicamente más baja que la dosis requerida para inducir una esterilidad casi completa en los machos. Para la mayoría de los propósitos, la dosis mínima será algo mayor que la dosis a la que se detiene la producción de huevos.

### **Mapeo de dosis y configuración de carga**

La tasa de dosis variará dentro de la cámara de irradiación. Para garantizar que todas las pupas reciban una dosis mínima, la mayoría de las pupas se irradiarán con una dosis algo más alta que la mínima especificada. Si la relación dosis-uniformidad (relación de la tasa de dosis máxima a mínima dentro de la cámara; ver SOP, [FAO / IAEA 2013a, b]) es demasiado alta, muchos de los insectos recibirán una dosis que reduce significativamente su competitividad. En esos casos puede ser necesario usar solo porciones de la cámara de irradiación donde la tasa de dosis sea más uniforme. Por ejemplo, se podrían usar tapones de espuma de poliestireno o material de densidad similar para llenar partes de una cámara si las tasas de dosis en esas áreas difieren sustancialmente con las partes más centrales de la cámara de irradiación

El tamaño y la forma del recipiente utilizado para contener los insectos durante el proceso de irradiación, su posición dentro del recipiente (si corresponde) y otra información relevante (por ejemplo, cualquier material que se use para excluir muestras de partes del recipiente donde la tasa de dosis es inapropiada), debe definirse para cada planta de acuerdo con el rango de dosis que se utilizará.

## **3.3. Irradiación y Control de Procesos**

### **Procedimiento de irradiación**

El centro de irradiación y el procedimiento que se utilice para irradiar insectos deben caracterizarse y probarse exhaustivamente para garantizar con un alto grado de confianza que el proceso esterilizará adecuadamente a los insectos. Los métodos utilizados para caracterizar un centro de irradiación están cubiertos por las directrices de ASTM (ASTM 2002a), y el método para dosimetría se proporciona en el capítulo 4. Para cada tipo de insecto y para cada tipo de irradiador, el mapeo de dosis ayudará a establecer los parámetros de proceso necesarios para administrar el rango de dosis correcto.

### **Control del proceso**

La liberación accidental de moscas que no se irradiaron adecuadamente podría ser desastrosa, especialmente para los programas TIE que se aplican para la erradicación de poblaciones extremadamente pequeñas y / o como una medida profiláctica para evitar el establecimiento de moscas recién introducidas (por ejemplo, en los programas de liberación preventiva en

California y Florida). Los siguientes procedimientos de control del proceso son esenciales para minimizar las posibilidades de tales accidentes.

**a) Pruebas de dosimetría y esterilidad:**

Las pruebas de dosimetría y esterilidad deben realizarse de manera rutinaria (idealmente en cada envío) para garantizar que el proceso de irradiación suministra la dosis esperada y obtiene el nivel deseado de esterilidad. El procedimiento para la dosimetría en un centro de radiación para TIE se describe detalladamente en SOP (FAO / IAEA 2013a, b), mientras que los procedimientos de prueba de esterilidad se describen en 7.1 Prueba de esterilidad. Además de las pruebas de dosimetría y esterilidad, los parámetros operativos relevantes del irradiador (p. Ej., Ajuste del temporizador y posición de los recipientes) deben ser monitoreados y documentados. Las pruebas de dosimetría y esterilidad deben realizarse de manera rutinaria (idealmente para cada envío) para garantizar que el proceso de irradiación suministra la dosis esperada y obtiene el nivel deseado de esterilidad. El procedimiento para la dosimetría en un centro de radiación para TIE se describe detalladamente en SOP (FAO / IAEA 2013a, b), mientras que los procedimientos de prueba de esterilidad se describen en 7.1 Prueba de esterilidad. Además de las pruebas de dosimetría y esterilidad, los parámetros operativos relevantes del irradiador (p. Ej., Ajuste del temporizador y posición de los recipientes) deben ser monitoreados y documentados.

**b) Etiquetas sensibles a la radiación:**

Un indicador sensible a la radiación es un material como un sustrato recubierto o impregnado con adhesivo, tinta o recubrimiento que puede fijarse o imprimirse en el recipiente y que sufre un cambio visual cuando se expone a radiación ionizante. Norma ISO / ASTM 51539: 2013. Estos indicadores están diseñados para ser específicos de la dosis; es decir, indican que han estado expuestos a un nivel mínimo de radiación (ver **Figura 2.4**, sección 2.3.1). Los expertos en dosimetría coinciden en que estos indicadores pueden proporcionar una indicación visual y cualitativa de que una muestra ha estado o no expuesta a una dosis absorbida predefinida. Sin embargo, los indicadores no pueden utilizarse como sustitutos de la dosimetría adecuada. Los indicadores sensibles a la radiación deben manejarse y almacenarse de acuerdo con las recomendaciones de sus fabricantes. Los indicadores que están expuestos a humedad excesiva, alta temperatura o radiación UV (por ejemplo, luz solar) antes o después de la irradiación pueden dar lecturas erróneas.

Se debe fijar firmemente el indicador sensible a la radiación a cada contenedor con insectos antes de que éstos se trasladen al irradiador. Si los insectos se empaquetan en bolsas de plástico, el indicador debe colocarse dentro (pero visible desde el exterior, ver **Figura 3.2**) o entre bolsas dobles de polietileno. Los indicadores se pueden comprar con una superficie frontal adhesiva para que puedan fijarse en el interior de la bolsa y verse fácilmente tanto antes como después de la irradiación.

La dosis absorbida a la que el indicador "cambia" debe estar por debajo pero cerca de la dosis mínima que se utiliza para irradiar los insectos. Los indicadores deben examinarse antes de su uso y descartarse si muestran algún signo de haber sido expuestos inadvertidamente a la radiación. Se deben verificar los lotes de indicadores para asegurar que su sensibilidad concuerda con la dosis especificada.





**Figura 3.2** Bolsa de polietileno con pupas de mosca del Mediterráneo estériles enviadas desde Guatemala (planta de cría de USDA-Moscamed) y abiertas en el centro de emergencia en Israel (El signo "OK" en el indicador fue hecho por el oficial de CC después de la irradiación y antes del envío).

***c) Control administrativo:***

Los procedimientos administrativos descritos aquí son aplicables a programas TIE en áreas donde la especie objetivo no se considera establecida. Se pueden permitir versiones ligeramente menos estrictas de estos procedimientos en algunos programas de supresión que se llevan a cabo contra poblaciones bien establecidas.

*Seguridad en el proceso de irradiación.* Cada centro de esterilización de insectos debe tener un Manual de Seguridad Radiológica aprobado oficialmente por las respectivas Autoridades Nacionales de Protección Radiológica (NRPA). La persona responsable de la seguridad radiológica y el operador de la instalación deben estar acreditados por la NRPA y deben tener una licencia válida para operar. La licencia debe renovarse periódicamente según lo requiera la NRPA respectiva. Antes de iniciar la actividad de irradiación, el operador autorizado debe asegurarse de que todas las medidas de seguridad estén en su lugar y funcionen correctamente. Antes de iniciar el procedimiento de irradiación, el operador debe registrar las condiciones del centro de irradiación en un libro de registro. Cualquier irregularidad en el funcionamiento del irradiador debe notificarse de inmediato a la persona responsable de la seguridad radiológica y el proceso debe cancelarse hasta nuevo aviso. El operador debe, en todo momento, observar las normas de seguridad siguiendo el Manual de seguridad radiológica de la instalación respectiva.

*Separación de los envases procesados.* Los envases donde se colocan las pupas deben sellarse de manera segura en un área separada del irradiador y de las áreas de empaque y carga.

Idealmente, la entrada y salida del irradiador deben ser accesibles desde diferentes cuartos para evitar confusiones con los contenedores de pupas irradiadas y no irradiadas. Obviamente esto no es posible con irradiadores donde las muestras se insertan y extraen del irradiador a través de una sola entrada. Los envases no deben romperse ni abrirse hasta que lleguen al centro de emergencia y liberación.

*Verificación en la planta de producción.* Antes de que los envases con insectos irradiados se retiren del centro de irradiación, el personal debe examinar el indicador sensible a la radiación en cada envase y proporcionar una certificación por escrito en el envase, como se muestra en la **Figura 3.2**, el cual muestra que recibió la dosis correcta. Se debe rechazar el contenedor si el indicador no estuvo completamente expuesto o si no hay ningún indicador adjunto.

*Verificación en el centro de emergencia y liberación.* Examine cada envase de empaque (botella o bolsa de plástico) de pupas. Las pupas en el contenedor deben destruirse si:

- el indicador sensible a la radiación está extraviado, no expuesto o parcialmente expuesto;
- no hay certificado en el contenedor mostrando que fue correctamente irradiado;
- el contenedor está roto o abierto.

### **3.4. Dosimetría**

El objetivo de la dosimetría es proveer una estimación precisa de la dosis de radiación máxima y mínima absorbida (en adelante, dosis) administrada durante el proceso de esterilización de pupas de moscas de la fruta.

Hay varias razones para realizar una dosimetría dependiendo del proceso. Por ejemplo, existen "procesos regulados", como la irradiación de alimentos y la esterilización de productos para el cuidado de la salud, donde es un requisito legal realizar la dosimetría. En otros casos, como la modificación del aislamiento de plástico en los cables eléctricos, la calidad del producto y la economía del proceso son las fuerzas impulsoras. En algunos otros casos, ayuda a escalar un proceso desde el nivel de investigación hasta el nivel industrial. Casi todos estos requisitos se aplican al caso de proyectos TIE. Las especies objetivo de los programas TIE son típicamente plagas importantes que afectan la agricultura o la salud humana, por lo que la garantía de que los insectos han sido adecuadamente irradiados es de vital importancia para garantizar la eficiencia de la TIE. Esto se logra a través de una dosimetría estandarizada, cuyo elemento clave es la medición de dosis precisas y confiables. La función principal de la dosimetría es establecer la dosis mínima y máxima requerida y también garantizar que se administre la dosis correcta a cada contenedor de insectos.

### 3.5. Literatura Relevante

- Anonymous. 2000.** Munsell® Soil Color Charts (Year 2000 Revised Washable Edition). Gretag Macbeth, New Windsor, New York, USA. 35 pp.
- ASTM Standard E170. 2010.** Standard Terminology Relating to Radiation Measurements and Dosimetry. ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI:10.1520/E0170-10.
- ASTM Standard E177. 2010** Standard Practice for Use of the Terms Precision and Bias in ASTM Test Methods. ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI:10.1520/E0177-10.
- ASTM Standard E456 2008.** Standard Terminology Relating to Quality and Statistics. ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI:10.1520/E0456-08E02.
- ASTM Standard E1026 2004.** Practice for Using the Fricke Reference-Standard Dosimetry System. ASTM International, West Conshohocken, PA. DOI:10.1520/E1026-04E01.
- Bushland R.C. and D.E. Hopkins. 1951.** Experiments with screw-worm flies sterilized by X-rays. *J. Econ. Entomol.* 44: 725-731.
- Bushland R.C. and D.E. Hopkins 1953.** Sterilization of screw-worm flies with X-rays and gamma rays. *J. Econ. Entomol.* 46:648-656.
- Dodd B. and R.J. Vetter. 2009.** Replacement of <sup>137</sup>Cs irradiators with X-ray irradiators. *Health Physics.* 96: 27-30.
- Dominiak B.C., S. Sundaralingam, L. Jiang, B.G. Fanson, S.R. Collins, C. Banos, J.B. Davies, and P.W. Taylor. 2014.** Evaluating irradiation dose for sterility induction and quality control of mass-produced fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 107: 1172-1178.
- FAO/IAEA. 2013a.** Dosimetry for SIT: Standard Operating Procedure for Gafchromic® film dosimetry system for gamma radiation. V 2.0, 43pp.
- FAO/IAEA. 2013b.** Dosimetry for SIT: Standard Operating Procedure for Gafchromic® film dosimetry system for low energy X radiation. V 1.0, 48pp.
- Fisher, K. 1997.** Irradiation effects in air and in nitrogen on Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) pupae in Western Australia. *J. Econ. Entomol.* 90(6): 1609-1614.
- IAEA. 1992.** Laboratory training manual on the use of nuclear techniques in insect research and control. Third edition. Technical Reports Series No. 336. IAEA, Vienna. Austria. 183pp.
- ISO/ASTM Standard 51275:2013.** Practice for Use of a Radiochromic Film Dosimetry System. ASTM International, West Conshohocken, PA. [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=62954](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=62954).
- ISO/ASTM Standard 51539:2013.** Guide for Use of Radiation-Sensitive Indicators. ASTM International, West Conshohocken, PA. [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=63642](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=63642).
- ISO/ASTM Standard 51940:2013** Guide for Dosimetry for Sterile Insect Release Programs. ASTM International, West Conshohocken, PA. [http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=61087](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=61087).
- Kuehni, RG. 2002.** "The early development of the Munsell system". *Color Research and Application* 27 (1): 20–27. doi:10.1002/col.10002.
- Mastangelo T, A.G. Parker, A. Jessup, R. Pereira, D. Orozco-Davila, A. Islam, T. Dammalage and J.M.M. Walder. 2010.** A new generation of X ray irradiators for insect sterilization. *J. Econ. Entomol.* 103(1): 85-94.
- Munsell, A.H. 1905.** A Color Notation. Boston: G. H. Ellis Co

- Munsell, A.H. 1912.** "A Pigment Color System and Notation". *The American Journal of Psychology* 23 (2): 236–244. doi:10.2307/1412843.
- Nestel D., E. Nemny-Lavy, S. M. Islam, V. Wornoyaporn and C. Cáceres. 2007.** Effects of pre-irradiation conditioning of medfly pupae (Diptera: Tephritidae): Hypoxia and quality of sterile males. *Fla. Entomol.* 90: 80-87.
- Nickerson, D. 1976.** "History of the Munsell color system, company, and foundation". *Color Research and Application* 1 (1): 7–10.
- Parker A.G. and K. Mehta. 2007.** Sterile insect technique: a model for dose optimization for improved sterile insect quality. *Fla. Entomol.* 90: 88-95.
- Ruhm, M.E. and C.O. Calkins. 1981.** Eye-color changes in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* pupae, a technique to determine pupal development. *Entomol. Exp. Appl.* 29: 237-240.
- Resilva S. and R. Pereira. 2014.** Age and temperature related pupal eye colour changes in various tephritid fruit fly species with a view to optimizing irradiation timing. *International Journal of Tropical Insect Science.* 34: S59-S65
- Zavala, J.L., M.M. Fierro, A.J. Schwarz, D.H. Orozco and M. Guerra. 1985.** Dosimetry practice for the irradiation of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied.). 23-30. *In* IAEA [ed.] High dose dosimetry, Proceedings of the International Symposium, IAEA STI/PUB/671, IAEA. Vienna, Austria.

## 4. Procedimientos de Empaque y Envío

El envío transfronterizo de insectos estériles se ha llevado a cabo de manera continua desde que se desarrolló por primera vez la Técnica del Insectos Estéril (TIE). Para 2001, el número total de insectos estériles enviados se estimó en más de 960 mil millones en más de 12,000 envíos a 22 países receptores desde 50 plantas de producción de insectos estériles en 25 países. Durante un período de casi 50 años, solo se ha registrado un problema asociado con el envío de insectos estériles vivos. Este caso estuvo relacionado con pupas del gusano barrenador no irradiadas que se enviaron a diferentes lugares para su liberación. El error humano fue la causa de este incidente que se habría podido evitar si se hubieran observado los procedimientos de operación estándar (POE) (ver 3.3 Control de irradiación y procesos). Este caso único en miles de envíos de insectos estériles llevados a cabo durante más de 50 años, muestra que cualquier sistema está sujeto a fallas e ilustra la importancia de la estricta observancia de los POE para mitigar el riesgo de que ocurran estas fallas. En medio siglo y más de 450 mil millones de pupas estériles de diferentes especies de moscas de la fruta tefrítidas (ver Apéndice D: Envíos transfronterizos de insectos estériles), ningún envío de insectos estériles se ha prohibido por las autoridades reguladoras o de protección vegetal nacionales o internacionales.

Se ha determinado que los riesgos de envíos transfronterizos de insectos estériles son insignificantes si se siguen los procedimientos descritos en este manual. Algunos países no regulan el envío de insectos estériles, otros solo requieren etiquetado y documentación, y otros regulan los insectos estériles bajo sus propias medidas de control biológico. Con el aumento en el número de países que aplican la TIE y el número de nuevas plantas de producción, esta guía ayudará a cualquier otra organización que envíe insectos estériles a seguir los procedimientos de operación estándar, asegurando así un envío seguro.

### 4.1. Procedimientos de Empaque

#### Empaque para envío

El tamaño y el peso de los paquetes pueden tener formas diferentes según el tipo de irradiador utilizado, pero deben diseñarse para minimizar la rotura (ver **Figura 4.1**).

Las bolsas de polietileno con pupas estériles se cargan en cajas de de cartón seguras para el envío a distancias cortas y largas por aire a los centros de emergencia y liberación. Como ejemplo, las cajas de envío utilizadas por la planta Moscafrut en México (**Figura 4.1 c**) que contienen 9 bolsas llenas de pupas irradiadas, están construidas con cartón corrugado de doble pared de 74 x 41 x 34 cm con una parte superior e inferior con superposición completa. Dentro de la caja, un compartimento central de 59 cm de largo, está forrado con capas adicionales de cartón corrugado. Las nueve bolsas de pupas se colocan longitudinalmente dentro de este compartimento central en tres capas de tres bolsas cada una. Cada capa y cada bolsa están separadas por separadores de cartón corrugado de doble y una pared, respectivamente. El espacio restante en cada extremo de la caja ( $\approx 10$  cm de la longitud de la caja) se usa para colocar dos paquetes de "hielo azul" congelado, envueltos en papel de periódico (**Figura 4.1, a, b**).



**Figura 4.1** Vista interior de las cajas (a, b) utilizadas para enviar pupas de la mosca del Mediterráneo estériles desde Guatemala (planta de cría de Moscamed del USDA), y pupas de la mosca Mexicana (c) estériles desde Tapachula, México, al norte del país.

En algunos casos, cada bolsa con pupas estériles contiene una etiqueta indicadora de irradiación, mientras que en otros se irradia toda la caja de envío. Esto permite la colocación de la etiqueta del indicador donde se puede ver externamente. Como ejemplo ver la **Figura 4.2**. Sin embargo, el color de la etiqueta puede cambiar cuando se expone directamente a la luz solar, el exceso de humedad y las altas temperaturas.

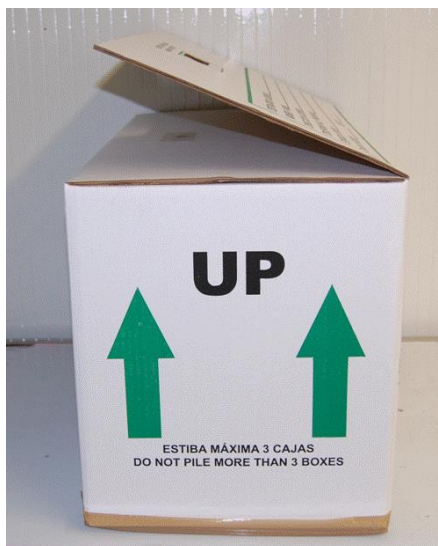
Una vez llena, una caja se cierra herméticamente con grapas de cartón (colocando grapas en lugares donde no lastimarán las bolsas de pupas) y dos bandas de cinta adhesiva de plástico reforzado con fibra (**Figura 4.2**).



**Figura 4.2** cajas usadas para el envío de pupas estériles de la mosca Mexicana desde Tapachula, México (planta de cría masiva Moscafruit).

### Etiquetado

Todas las cajas deben etiquetarse con las palabras: "Frágil" y "Material biológico". En algunos casos, con la mención "Insectos vivos" y alguna indicación de las condiciones de almacenamiento ("Este lado hacia arriba", "Manejar con cuidado" "No apilar más de 3 cajas") también deben de estar presentes en las cajas (**Figura 4.3**) . Como se indica a continuación (ver 4.2: Procedimientos de envío y manejo), las cajas no deben mantenerse a temperaturas inferiores a 18-20 °C.



**Figura 4.3** Etiquetas colocadas en cajas que contienen pupas estériles de la mosca Mexicana de la fruta enviadas desde Tapachula (Planta Moscafruit) a otras partes de México o California, EE. UU.

Para facilitar el seguimiento de los envíos, éstos deben tener información completa sobre la ubicación del destinatario, un número de envío y, además, las cajas de cada envío deben numerarse consecutivamente con letras grandes y claras en el exterior de la cajas; por ejemplo, "Envío 2729, caja 3 de 14".

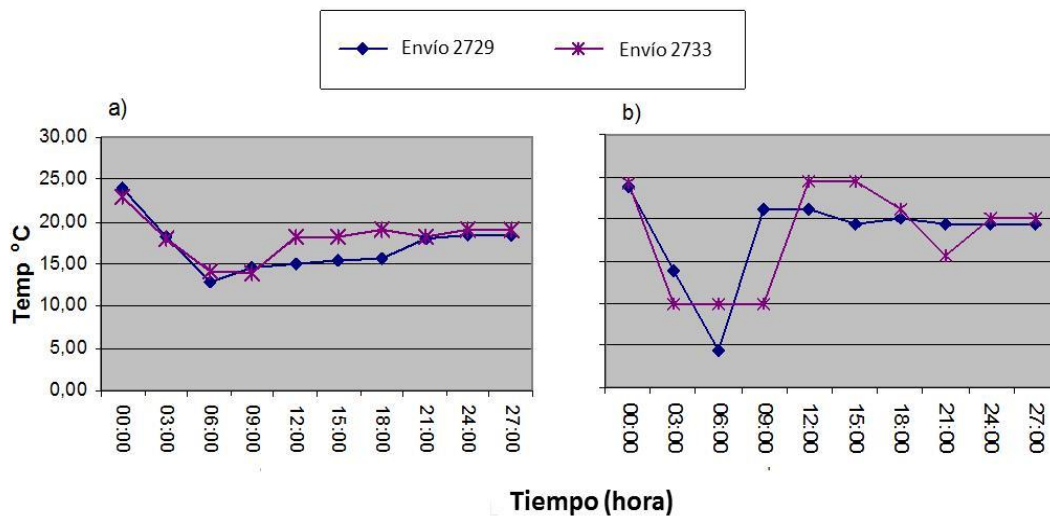
## 4.2. Procedimientos de Envío y de Manejo

Las cajas no deben manejarse bruscamente ni someterse a apilamientos inadecuados para evitar la acumulación de niveles no deseados de calor metabólico. Las pupas irradiadas también son sensibles a la vibración excesiva que podría causar altos niveles de mortalidad. Antes del envío y durante el tránsito, las cajas selladas deben colocarse en instalaciones cercanas y limpias para evitar el transporte de plagas contaminantes.

### Monitoreo de las condiciones de envío

Las cajas con pupas deben mantenerse a 20 °C o poco menos durante el transporte. En todos los casos, los contenedores no deben mantenerse bajo temperaturas de congelamiento ni pasar más de unos minutos a temperaturas arriba de 30 °C, o bajo una exposición prolongada a la luz solar directa que provocaría temperaturas internas superiores a 30 °C.

Idealmente deben colocarse data loggers fuera y dentro de las cajas para monitorear las temperaturas de las cajas de cartón durante el transporte, ya que variaciones drásticas podrían afectar la calidad de las moscas emergidas, particularmente en el tiempo de la emergencia y, como consecuencia, la edad de los insectos liberados. En la **Figura 4.4** podemos observar variaciones de temperatura (tanto dentro como fuera de las cajas) en algunos envíos desde Guatemala a Florida, EE. UU.



**Figura 4.4** Registro de temperatura en dos envíos de machos estériles de *Ceratitits capitata* desde Guatemala a Florida: a) dentro de la caja, b) fuera de la caja.

Para transportación local se deben usar camionetas con aire acondicionado si las condiciones ambientales pueden provocar el sobrecalentamiento de las pupas. En envíos de larga distancia, las pupas suelen transportarse por aerolíneas comerciales en una bodega de carga donde la temperatura y la presión del aire se mantienen a niveles de "cabina". La ruta de la aerolínea debe seleccionarse para minimizar los puntos de transbordo y el tiempo total del envío. Aunque en algunos envíos las pupas se han mantenido bajo hipoxia durante 40 horas, la calidad comienza a disminuir rápidamente cuando la hipoxia se extiende más allá de  $\approx 24$  horas.



El supervisor de empaque y envío debe completar una hoja de datos con las especificaciones y condiciones de las pupas estériles que se envían. La hoja de datos debe estar firmada por el supervisor y una copia siempre debe acompañar al envío. El supervisor también debe presentar una copia de cada uno de los documentos (ver 4.3 Documentos de Envío) que acompañan al envío, independientemente del destino, sea nacional o internacional.

Al llegar al destino final y después de que el retiro del envío haya sido autorizado por las autoridades fitosanitarias y aduaneras nacionales, el receptor debe verificar cuidadosamente la hoja de datos que acompaña al envío y verificar: (i) que la hoja de datos ha sido firmada por el remitente, y (ii) que el contenido del paquete coincide con la información detallada en la hoja de datos. Es de particular importancia verificar la condición de las etiquetas de irradiación en cada contenedor de pupas. Las etiquetas deben mostrar claramente que fueron expuestas a la dosis de irradiación absorbida especificada como se explica en 3.3: Irradiación y control de procesos. Además de esta etiqueta indicadora de irradiación, se recomienda que cada caja sea sellada y firmada por el personal de la planta que supervisa el proceso de irradiación y envío (**Figura 2.6**). El receptor debe firmar una declaración de que el producto se ha recibido de acuerdo con las especificaciones. Cualquier discrepancia en el contenido del envío se debe informar de inmediato al remitente y se debe tomar una decisión sobre mantener o descartar el envío. Cualquier señal visual inadecuada en las etiquetas de irradiación de pupas, es suficiente para eliminar todo el contenido del envío.

### **4.3. Documentos de Envío**

Los paquetes deben ir acompañados de la documentación necesaria para garantizar una entrega oportuna y segura. Los remitentes deben estar atentos a lo siguiente:

- La documentación debe cumplir: (i) con las regulaciones relevantes de los países exportadores e importadores, especialmente en lo que respecta a permisos de importación, permisos de tránsito nacionales, certificados fitosanitarios, certificados de irradiación, etiquetado y notificación, y (ii) a las regulaciones de tránsito si el envío transita por un tercer país, es decir, un país que ni es el de origen ni el destino del envío (**Figura 4.5**).
- Los documentos deben incluir instrucciones claras para los operadores y funcionarios en el punto de embarque, transbordo y entrada, sobre cómo debe tratarse el paquete para evitar daños al contenido, y las medidas que se deben tomar si el paquete ha sido lastimado.
- La documentación debe indicar que el contenido del paquete es perecedero y, por lo tanto, debe permitirse el tránsito rápido del material.
- El receptor debe tener la documentación necesaria para proporcionar información rápida cuando el paquete se retrasa.
- El receptor puede solicitar datos sobre la calidad de los insectos estériles que se envían.
- El receptor debe solicitar, para cada envío, una hoja de datos con un mínimo de información.
- Los documentos deben incluir instrucciones claras para los funcionarios en los puntos de transbordo o entrada sobre cómo debe desecharse un paquete que se encuentre perdido.



**Figura 4.5** Documentos de “Tránsito” para el envío de pupas de la mosca Mexicana de la fruta desde Tapachula al estado de California, Estados Unidos.

#### 4.4. Literatura Relevante

**Brazzel, J.R., C. Calkins, D.L. Chambers and D.B. Gates. 1986.** Required quality control tests, quality specifications, and shipping procedures for laboratory produced Mediterranean fruit flies for sterile insect control programs. APHIS 81-51, USDA-APHIS, Hyattsville, MD, USA.

**Enkerlin, W.R and M.M. Quinlan. 2004.** Development of an International Standard to facilitate the Transboundary Shipment of Sterile Insects, pp 203-212, IN: Barnes, B.N. (Ed.) Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Isteg Scientific Pubs. Irene, South Africa.

**FAO/IAEA. 2000.** DA.10.16 Gafchromic® Dosimetry System for SIT, Standard Operating Procedures, IAEA, Vienna, Austria, 42 pp.

**FAO/IAEA. 2001.** Discussion Paper on Transboundary Shipment of Sterile Insects. Prepared by an FAO/IAEA Consultants Group; 30 July to 3 August 2001, Vienna, Austria. 28pp.

**FAO/IAEA. 2007.** Guidance for Packing, Shipping, Holding and Release of Sterile Flies in Area-Wide Fruit Fly Control Programmes (ed. by W. Enkerlin), Rome, Italy, 134 pp.

**Heneberry, T.J. 1983.** Considerations in sterile insect release methodology. USDA-ARS.

**International Plant Protection Convention (IPPC). 2012.** Glossary of Phytosanitary Terms. ISPM Pub. No.5, FAO, Rome.

**Planta Moscafrut SAGARPA-IICA. 2009.** Manual de Envíos del Material Biológico Producido en la Planta Moscafrut. Metapa de Domínguez Chiapas, México, 30 pp.

**Zavala, J.L., M.M. Fierro, A.J. Schwarz, D.H. Orozco and M. Guerra. 1985.** Dosimetry practice for the irradiation of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied.). 23-30. In IAEA [ed.], High dose dosimetry, Proceedings of the International Symposium, STI/PUB/671. IAEA. Vienna, Austria.

## **5. Pruebas de Control de Calidad de Rutina en los Centros de Emergencia y Liberación de Moscas**

Los centros de emergencia y liberación de moscas estériles son responsables de los pasos finales para un uso efectivo de la TIE en el campo. El manejo correcto de los insectos estériles (IE) en esta etapa es crucial para entregar en el campo IE sexualmente maduros y robustos para llevar a cabo el control requerido de la población plaga.

Para garantizar que los procedimientos seguidos durante el envío y el manejo harán que los IE estén en la condición deseada, se recomienda una serie de pruebas para documentar su desempeño. Estas pruebas documentan, en cada paso del proceso, la calidad del IE antes y después de cada fase de manejo que ocurre en los centros de emergencia y liberación de moscas. Las pruebas deben realizarse en las siguientes etapas:

- Al arribo del envío de los IE
- Después de los proceso de manejo y enfriamiento
- Después de la liberación de los IE en el campo

Estas evaluaciones, cuando se comparen con las obtenidas en las planta de producción, deberán permitir la detección de cualquier pérdida en la calidad del IE y en qué fase del proceso ocurrió, lo que permitirá iniciar medidas correctivas. La estandarización de estos procedimientos a nivel mundial también permitirá el intercambio de información y las comparaciones del desempeño de los IE entre los centros de emergencia y liberación de moscas.

### **5.1. Guía para el Muestreo de Insectos para Pruebas de CC de Rutina**

Para las pruebas de control de calidad al arribo se debe utilizar el mismo procedimiento de muestreo que en las plantas de cría masiva (ver 2.1 Pautas para el muestreo de insectos para pruebas de control de calidad de rutina). La única diferencia es el muestreo de adultos en el post manejo / enfriamiento y liberación, pero esto se aborda en el procedimiento de cada prueba (voladoras absolutas y supervivencia bajo estrés).

Siempre que se sigan los procedimientos de manejo en los centros de emergencia y liberación de moscas como se describen en los manuales existentes (i.e., Guía para el empaque, envío, confinamiento y liberación de moscas estériles en programas de control de moscas de la fruta en áreas amplias FAO / OIEA, 2007; Manual Moscafrut 2010; USDA-APHIS 2008), no se deberán observar grandes desviaciones en la calidad de los insectos.

Los cambios en los procedimientos de manejo en los centros de emergencia y liberación de moscas, como la densidad de confinamiento en los contenedores de empaque (PARCS y / o Torres), los regímenes de temperatura, humedad y tipo de alimento que podrían usarse, deben validarse adecuadamente para mantener la calidad de la mosca estéril.

### **5.2. Pruebas de Control de Calidad al Arribo**

La evaluación de la calidad del insecto estéril al llegar al centro de emergencia y liberación es crucial para corroborar que las condiciones de envío combinadas con la calidad del insecto fueron adecuadas para su manejo y liberación. Las medidas precisas de CC que permiten

comparaciones entre el envío y el arribo son muy importantes. Para fines de comparación, el equipo debe calibrarse y los procedimientos de prueba deben estandarizarse y ser similares a los utilizados en las plantas de cría masiva. Las evaluaciones para comparar la calidad de los insectos están representadas por las siguientes pruebas:

- Indicador (etiqueta) de radiación
- Peso de pupa
- Emergencia y habilidad de vuelo
- Supervivencia bajo estrés
- Proporción sexual y tiempo de emergencia

### **5.2.1. Indicador de Radiación**

Al llegar el envío de insectos estériles al centro de emergencia y liberación, se debe realizar un examen cuidadoso de la etiqueta de radiación para confirmar que ha cambiado de color (**Figura 2.6**). Si no hay evidencia de que el color haya cambiado, se debe destruir el paquete completo.

### **5.2.2. Peso de Pupa**

#### **Objetivo**

Determinar el peso de pupa de los insectos estériles en el momento de su arribo al centro de emergencia y liberación y medir el efecto del empaque y envío.

#### **Discusión**

En el **Cuadro 2.1** se presenta una compilación de diferentes especies de moscas de la fruta de lo que se considera un peso apropiado de pupas (ver 2.1.1 Peso de Pupa). El peso de la pupa, según lo determinado por los centros de emergencia y liberación al arribo, es una comparación directa con el valor determinado cuando las pupas salieron de la planta de cría. El peso de la pupa se reduce a medida que se acerca la emergencia del adulto (Langley 1970; Nestel *et al.* 2003), pero debe ser una reducción mínima entre la salida de la planta de cría masiva y la llegada al centro de emergencia y liberación.

#### **Equipo y procedimientos**

Esta prueba debe ser llevada a cabo en los centros de emergencia y liberación de manera exacta a como es desarrollada en la planta de cría masiva (ver 2.1.1 Peso de Pupa).

### **5.2.3. Emergencia y Habilidad de Vuelo**

#### **Objetivo**

Obtener una estimación precisa del porcentaje de pupa recibida por el centro de emergencia y liberación que emerge y produce adultos capaces de volar.

#### **Discusión**

Los centros de emergencia y liberación de moscas reciben envíos de pupas de diferentes distancias donde se encuentra las plantas de cría masiva. Para garantizar que se usen las condiciones apropiadas de manejo y envío de los insectos estériles, los centros de emergencia y liberación deben determinar el porcentaje de emergencia y el porcentaje de adultos que

pueden volar. Los resultados de estas evaluaciones se deben comparar con los obtenidos en la planta de cría masiva antes del envío (ver 2.2.2 y 2.3.2).

### **Equipo y condiciones de prueba**

Para determinar el porcentaje de emergencia y de adultos que pueden volar, se deben usar los mismos equipos y condiciones de prueba que los descritos en la sección 2.2 (ver 2.2.2. Emergencia y habilidad de vuelo).

### **Procedimientos**

La principal diferencia entre los métodos de cómo realizar estas pruebas en las plantas de cría masiva y en los centros de emergencia y liberación, es que la edad fisiológica de las pupas a la llegada es incierta (ya que se han visto afectadas por la variación en las temperaturas de envío e hipoxia). Los centros de emergencia y liberación deben abrir inmediatamente los contenedores con pupas (romper la hipoxia), medir la temperatura y preparar las pupas para la prueba.

### **Interpretación**

El porcentaje de emergencia y de adultos que pueden volar reflejan si las condiciones de envío de insectos estériles al centro de emergencia y liberación fueron adecuadas. Un período largo de hipoxia puede reducir estos valores a medida que aumenta el tiempo en hipoxia (FAO / OIEA, 2007). Una humedad relativa más baja en los centros de emergencia y liberación puede reducir el porcentaje de emergencia y de adultos que pueden volar. Una compilación para las diferentes especies de moscas de la fruta de lo que actualmente se considera un porcentaje apropiado de emergencia y de adultos que pueden volar se presenta en el **Cuadro 2.2.** (ver 2.2.2. Capacidad de Emergencia y Habilidad de Vuelo).

## **5.2.4. Supervivencia bajo Estrés**

### **Objetivo**

Determinar la supervivencia de las moscas estériles después de los procedimientos de cría masiva, esterilización, empaque y envío.

### **Procedimientos**

Esta prueba debe conducirse como se describe en la sección 2.2.3 Supervivencia bajo Estrés.

### **Discusión**

La determinación de este valor se debe comparar con la supervivencia de los insectos estériles obtenida en la planta de cría masiva antes del envío al centro de emergencia y liberación. Esta comparación también permite evaluar los procedimientos de empaque y envío. Como consecuencia de estas comparaciones, los receptores de moscas estériles pueden recomendar a las plantas la necesidad de ajustes a sus condiciones de cría, empaque y envío.

### **Interpretación**

La supervivencia bajo estrés puede verse afectada por las condiciones durante la entrega (por ejemplo, temperatura, tiempo en hipoxia). Si se detectan diferencias en la supervivencia bajo estrés entre la planta de cría masiva y los centros de emergencia y liberación, es necesario investigar las condiciones que afectaron durante el envío.

## **5.2.5. Proporción Sexual y Tiempo de Emergencia**

### **Objetivo**

Determinar la proporción sexual (machos y hembras) en un envío de pupas estériles y el número de horas necesarias, después del arribo, para alcanzar el 50% de emergencia de adultos estériles, así como la edad de éstos al momento de su liberación.

### **Discusión**

Al arribo de las pupas al centro de emergencia y liberación de moscas, se deben tomar muestras para determinar la proporción de sexos de las pupas enviadas. Esta prueba podría combinarse con la determinación del tiempo de emergencia para evitar la duplicación de esfuerzos. Para las cepas de sexado genético, la proporción sexual está fuertemente sesgada hacia los machos, sin embargo, la prueba debe realizarse ya que un aumento en el número de hembras conducirá a mayores detecciones de hembras estériles en las trampas de monitoreo.

El tiempo de emergencia está relacionado con la edad de las pupas en el momento de llegada al centro de emergencia y liberación y la temperatura en este lugar, el tiempo en hipoxia y las condiciones de envío. Es importante determinar el tiempo de emergencia de los insectos estériles para calcular la edad aproximada de éstos en el momento de la liberación. Esta edad debe ser lo más cercana posible al inicio de la actividad de apareamiento, por ejemplo, para la mosca del Mediterráneo corresponde una edad de 5 días.

### **Equipo y procedimientos**

El equipo y los procedimientos para determinar la proporción de sexos y el tiempo de emergencia se describen en la sección 2.3.4. Proporción sexual y tiempo de emergencia.

### **Interpretación**

Ver sección 2.3.4. Proporción sexual y tiempo de emergencia. Los gerentes de los centros de emergencia y liberación de moscas deben ser conscientes de que las condiciones ambientales previas a la liberación de insectos afectan su tiempo de emergencia y maduración sexual.

## **5.3. Control de Calidad Post Manejo/Enfriamiento**

### **5.3.1. Voladoras**

#### **Objetivo**

Determinar el porcentaje de habilidad de vuelo de los insectos estériles después del enfriamiento.

#### **Discusión**

Algunos centros de liberación y liberación de moscas usan bolsas de papel o recipientes para liberar los insectos estériles directamente, mientras que otras enfrían las moscas estériles para su recolección y liberación. El muestreo y el manejo de las moscas es diferente para cada uno de estos sistemas de liberación.

#### **Liberación del adulto frío**

En este sistema los insectos estériles se exponen a temperaturas frías para inmovilizarlos y facilitar su manejo y eventual distribución en el campo. Este proceso ocurre dentro de cuartos

fríos especialmente diseñados para mantener un rango de 3-4 °C (38 °F). Las cajas plásticas de liberación para adultos (PARC) y / o las torres de emergencia (TE), que contienen moscas estériles se llevan adentro de los cuartos fríos para recibir el "tratamiento de frío" por un periodo que puede oscilar entre 30 y 60 minutos. Los insectos enfriados se canalizan a las cajas de liberación para su dispersión en el campo. Como medida del número real de moscas que se liberarán, así como de la calidad de los procesos (manejo, enfriamiento y calidad de los insectos per se), se debe determinar el porcentaje de adultos voladores.

### Equipo

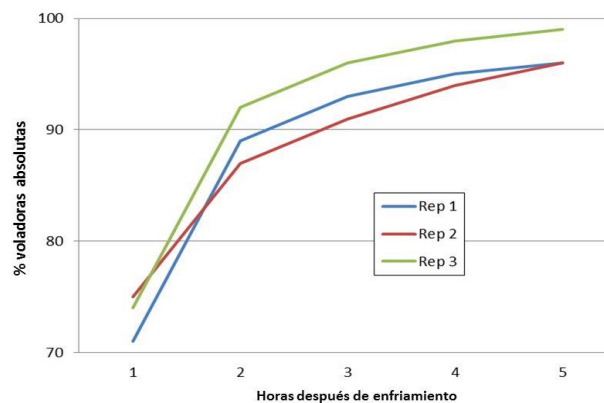
- Se usa el mismo equipo que para la prueba de Emergencia y habilidad de vuelo (sección 2.2.2.), sin embargo, adicionalmente se requiere lo siguiente:
- Vasos de 100 ml y tapas.
- Bandejas de servicio
- Congelador
- Pinzas entomológicas suaves

### Procedimiento

Utilizando vasos de precipitados se recolectan al azar 5 muestras de adultos estériles enfriados (5 ml para mosca del Mediterráneo) de cada procedimiento de enfriado (el volumen recolectado debe ajustarse de acuerdo con la especie de mosca), para recolectar aproximadamente 100 moscas por muestra.

Se usan contenedores con peso de tara conocido para pesar las 5 muestras de moscas adultas. Las muestras de moscas se transfieren a las cajas de Petri individuales y se coloca un tubo negro encima de cada caja (como se describe en la sección 2.2.2: Prueba de habilidad de emergencia y vuelo).

Después de terminar la preparación de la muestra, las cajas de Petri se transfieren a una habitación con temperatura controlada a 25 +/- 1 oC y 65% de HR. Después de un período de varias horas (cuatro horas para la moscamed, ver **Figura 5.1**), los tubos de vuelo se cubren con una tapa y se transfieren / colocan dentro de un congelador para inmovilizar las moscas durante un mínimo de 30 minutos para después determinar el peso de los insectos restantes en los tubos. Estos tiempos deben ajustarse según la especie de mosca.



**Figura 5.1** El porcentaje acumulado de *Ceratitis capitata* que salieron del tubo (voladoras absolutas) cinco horas después del enfriamiento.

Los adultos voladores representan el porcentaje de los adultos emergidos capaces de volar después del proceso de empaque, enfriamiento y liberación. El valor de este parámetro se calcula por la diferencia entre los voladores totales en la muestra y los no voladores que permanecieron dentro de los tubos de vuelo ajustados por el porcentaje de emergencia de adultos que se obtuvo en la prueba de Habilidad de Vuelo (5.2.3). El porcentaje de Adultos Voladores (AV) se calcula de la siguiente manera:

$$AV = [(T+PTM-PNV) / (T+PTM)] \times PE \times 100$$

T = peso del contenedor (tara).

PTM = peso del total de moscas y residuos.

PNV = peso de las no voladoras y residuos que permanecen en el contenedor.

PE = Porcentaje de emergencia

Adicionalmente, es importante conocer el promedio del peso de moscas adultas individuales después del enfriamiento con el objeto de calcular el número total de moscas dentro de la caja de liberación.

### **Interpretación**

La disponibilidad de una cantidad suficiente de insectos estériles para la liberación en el campo es un requisito para la aplicación exitosa de la TIE. El manejo de insectos en las últimas fases de producción, emergencia y liberación se convierte en un tema relevante. El mal manejo en las últimas etapas podría reducir severamente la cantidad de insectos estériles disponibles, haciendo de la TIE un esfuerzo costoso. Factores como la humedad y la condensación dentro de las cámaras frigoríficas y las cajas de liberación pueden tener un impacto severo en los porcentajes finales de voladoras. Las condiciones requeridas para una aplicación exitosa de la técnica del adulto frío variarán de acuerdo con la ubicación de los centros de emergencia y liberación de moscas. Los gerentes deben asegurarse de que se cumplan las condiciones para una óptima viabilidad de las moscas estériles. Para los usuarios de liberación con bolsas, las condiciones de hacinamiento durante la retención, manejo y transporte pueden tener un efecto severo en la reducción del porcentaje de adultos voladores adultos. Las prácticas operativas deben ser validadas / cuestionadas antes de su completa implementación.

### **5.3.2. Sobrevivencia bajo Estrés de Moscas Enfriadas / Liberadas**

#### **Objetivo**

Esta prueba es una medición relativa de las reservas disponibles de la mosca adulta en diferentes periodos críticos: a la emergencia, después del manejo/enfriamiento y después de la liberación.

#### **Procedimiento**

Las necesidades de equipo y los procedimientos para esta prueba son similares a los descritos en la sección 2.2.3: Supervivencia bajo estrés. Sin embargo, la prueba difiere en que las moscas adultas se recolectan después del manejo / enfriamiento. Esto se realiza tomando cinco muestras de 20 ml de la caja de liberación para adultos enfriados, o de niveles de torre o cajas de PARC que se colocan a temperaturas frías para aletargar las moscas para la prueba.



Las moscas muestreadas se colocan dentro de una jaula de plexiglás de 30x30x30; 30 minutos después, se toman al azar 100 moscas usando un aspirador y se colocan dentro de una caja de Petri como se describe en 2.2.3. Se deben hacer cinco repeticiones.

### **Interpretación**

Además de lo que se ha indicado en la sección 2.2.3: Supervivencia bajo estrés, la supervivencia de las moscas estériles durante el proceso de cría y de manejo en los centros de emergencia y liberación se puede optimizar proporcionando a los adultos buena calidad y cantidad de alimento. Aspectos como la accesibilidad de los insectos al alimento, así como las condiciones de hacinamiento dentro de los contenedores juegan un papel importante para mantener la calidad de los insectos. Los centros de emergencia y liberación deben validar sus protocolos de emergencia y manejo de moscas para garantizar condiciones adecuadas para los insectos estériles durante todo el proceso.

## **5.4. Control de Calidad después de la Liberación**

Las evaluaciones de control de calidad después de la liberación deben llevarse a cabo para determinar la calidad final de las moscas estériles en el campo. Las pruebas deben incluir al menos una estimación del número de voladoras absolutas, así como el porcentaje de supervivencia bajo estrés.

Las muestras de moscas para realizar estas pruebas deben obtenerse según los procedimientos para voladoras absolutas después del enfriamiento (ver sección 5.3.1 Adultos voladores). Las muestras, una vez disponibles, deben colocarse dentro de bolsas de velcro (ver más abajo para más detalles), después colocarlas dentro de la máquina de liberación. Este método permite que las muestras viajen en condiciones similares a las moscas que se liberan. Al finalizar el vuelo, las muestras se recuperan, se enfrían brevemente para manipular las moscas y se realizan las pruebas de voladoras absolutas y de supervivencia.

En el caso de liberación utilizando bolsas de papel y / o contenedores que no requieran enfriamiento, se selecciona al azar una bolsa o contenedor marcado y se deja que viaje bajo las condiciones de las bolsas / contenedores de liberación reales. La muestra seleccionada se lleva a la instalación para realizar las dos pruebas.

### **5.4.1. Adultos Voladores**

#### **Objetivo**

Obtener una estimación del porcentaje de moscas que tienen la capacidad de volar después del proceso de liberación.

#### **Discusión**

Las moscas estériles se exponen a bajas temperaturas para inmovilizarlas y facilitar su manejo y eventual distribución en el campo. Las moscas enfriadas se canalizan a las cajas de los aviones para su dispersión aérea. Como una medida del efecto del tiempo de enfriamiento y tiempo ferry de la liberación aérea sobre la calidad del insecto per se, se debe determinar el porcentaje de adultos voladores después de la liberación.

#### **Equipo**

Se utiliza el mismo equipo que para voladoras absolutas después del enfriamiento (sección 5.3.1 Adultos voladores), pero además, se necesita el siguiente equipo:

- Cinco bolsas Velcro (bolsas-red de 15 x 20 cm, 2 caras unidas con Velcro; ver **Figura 5.2b**).

### Procedimiento

Durante el proceso de noqueo en los cuartos fríos, se toman al azar 5 muestras de 5 ml de moscas enfriadas y se introducen cuidadosamente en 5 bolsas de red de velcro (**Figura 5.2b**). Estas bolsas se colocan dentro de la caja de liberación para acompañar al resto de las moscas estériles durante el tiempo del ferry y el tiempo de liberación (**Figura 5.2a**). Cuando el avión regresa, las bolsas de velcro se transportan al laboratorio de control de calidad, donde las moscas deben enfriarse brevemente para manejarlas y realizar las pruebas de voladoras absolutas y de supervivencia como se describió previamente.



**Figura 5.2** (a) Bolsas velcro con moscas estériles enfriadas y colocadas dentro de una máquina de liberación aérea; (b) Bolsas velcro que contienen 100 moscas enfriadas para realizar las pruebas de voladoras absolutas y supervivencia bajo estrés.

### Interpretación

Los adultos voladores se determinan por la diferencia de peso entre el total de moscas en la muestra y las no voladoras que quedaron dentro, y se ajustan por el porcentaje de emergencia. El porcentaje de adultos voladores se calcula con la fórmula que se muestra en la sección 5.3.1. Adultos voladores.

### 5.4.2. Prueba de Supervivencia después de Liberación

#### Objetivo

Determinar la supervivencia de los insectos estériles después de haber pasado por todos los pasos de manejo y de liberación en el campo.

#### Discusión

La determinación de la supervivencia de la mosca adulta después de la cría, irradiación, manejo del envío, el enfriamiento y la liberación, es una prueba relevante para predecir qué tan exitosa podría ser la TIE si los insectos estériles sobreviven bien después de todo el proceso. Esta prueba debe realizarse con alimento y agua para evaluar su potencial de supervivencia. Además, la prueba podría realizarse en paralelo con agua y sin alimento para estimar las reservas de nutrientes de las moscas estériles.

## Equipo y procedimientos

Se deben tomar al azar cinco muestras de 20 ml cada una de moscas enfriadas y se deben introducir cuidadosamente en cinco bolsas de velcro. Estas bolsas se colocan dentro de la caja de liberación terrestre o aérea para acompañar al resto de las moscas estériles durante el tiempo del ferry y el momento de la liberación (**Figura 5.2a**). Cuando regresa la caja de liberación, las bolsas de velcro se transfieren al laboratorio de control de calidad, donde las moscas se liberan dentro de una jaula de plexiglás de 30x30x30 cm. Se toman cinco muestras de 100 moscas y se colocan dentro de una jaula de malla fina de tamaño similar que se puede mantener en el laboratorio o en el campo. Al menos cada 24 h se debe registrar el número de moscas muertas, aunque se pueden obtener datos más precisos si se registran con mayor frecuencia. La prueba debe extenderse el tiempo requerido para superar el 50% de mortalidad. La frecuencia de prueba recomendada es mensual.

## Interpretación

La sobrevivencia se expresa como la cantidad de horas acumuladas en las que sobrevive el 50% de las moscas. Esta determinación final de la sobrevivencia de la mosca estéril después de todo el proceso de cría y liberación es relevante como referencia para comparar con los valores de la sobrevivencia en el campo, así como con los datos provenientes de la prueba de Dispersión y Sobrevivencia de Liberación-Recaptura y la prueba de Sobrevivencia en el Campo.

## 5.5. Literatura Relevante

**Dominiak B.C., S. Sundaralingam, L. Jiang, A.J. Jessup and I.M. Barchia. 2010.** Impact of marker dye on adult eclosion and flight ability of mass produced Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera:Tephritidae). Aust. J. Ent. 49: 166-169.

**FAO/IAEA. 2007.** Guidance for Packing, Shipping, Holding and Release of Sterile Flies in Area-Wide Fruit Fly Control Programmes (ed. by W. Enkerlin), Rome, 134 pp.

**Langley, P. A. 1970.** Physiology of the Mediterranean fruit fly in relation to the sterile-male technique, pp. 25-32. *In*: Anon. (ed.), Physiology of the Mediterranean fruit fly in relation to the sterile-male technique. Proceedings of a panel held in Vienna in 1969. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

**Manual de Control Autocida de la Mosca del Mediterraneo Esteril por el Sistema de Adulto Frío, 2004.** Pruebas de Control de Calidad de la Mosca del Mediterráneo Estéril, por la Técnica de Adulto Frío. Guatemala, 58p.

**Nestel, D., D. Tolmasky, A. Rabossi, and L.A. Quesada-Allué. 2003.** Lipid, carbohydrates and protein patterns during metamorphosis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 96(3): 237-244.

**Planta Moscafruit. 2010.** Manual de Control de Calidad de Moscas de la Fruta Estériles y Parasitoides (procedimientos para evaluar el Producto en Centros de Empaque), Dirección Moscas de la Fruta DGSV-SENASICA-SAGARPA, Mexico, 63p.

**USDA/APHIS. 2008.** United States, Mexico and Guatemala Fruit Fly Emergence and Release Facilities Review, 79 p.

**Weldon C.W., S. Yap and P.W. Taylor. 2013.** Desiccation resistance of wild and mass-reared *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research 103: 690–699.

## **6. Pruebas de Control de Calidad Periódicas Requeridas en Plantas de Cría Masiva y / o Centros de Emergencia de Moscas y Liberación**

### **6.1. Prueba de Esterilidad**

#### **Objetivo**

Asegurar que las moscas liberadas en el campo tienen el grado de esterilidad requerido.

#### **Discusión**

El ensayo biológico de la esterilidad inducida por radiación es un componente esencial del control de calidad del procedimiento de radiación. Generalmente se lleva a cabo tanto en la planta de producción como en el centro de emergencia y liberación de moscas.

La uniformidad de la edad fisiológica en la irradiación es un determinante crítico de la medida en que los procedimientos de esterilización afectan la calidad de las moscas. La edad óptima en el momento de la irradiación es típicamente de 24 a 48 horas antes de la emergencia del adulto. La irradiación de las pupas demasiado jóvenes disminuye la vitalidad general de los insectos, mientras que la irradiación demasiado cercana a la emergencia puede dar como resultado una esterilidad incompleta.

#### **Equipo**

- Jaula de emergencia
- Jaulas de prueba (Plexiglas o malla) con agua y alimento
- Aspirador o bomba de succión
- Cajas de Petri con tapas forradas con sustrato oscuro y absorbente (ejemplo, papel filtro negro), sobre piezas de esponja sintética cortadas para ajustarse y humedecida con agua
- Incubadora u otro espacio controlado ambientalmente
- Microscopio de disección
- Pincel de cerdas finas

#### **Condiciones de prueba**

- Temperatura  $25 \pm 1^\circ \text{C}$
- Humedad  $65 \pm 15\% \text{RH}$
- Intensidad luminosa 1,500 lux
- Fotoperiodo 14 horas luz:10 horas oscuridad

#### **Frecuencia de la prueba**

La evaluación de la esterilidad es esencial si un componente del proceso de irradiación se ha alterado significativamente: un cambio en la dosis requerida, una fuente de irradiación diferente, una edad de pupas diferente a la irradiación, un recipiente de irradiación diferente. Cualquier cosa que pueda alterar la cantidad de radiación recibida por las pupas afectará el nivel de esterilidad inducida en las moscas resultantes. Aunque la prueba se requiere periódicamente, se puede ejecutar de forma rutinaria para cada envío a fin de garantizar que el proceso de radiación se ha llevado a cabo correctamente.

#### **Procedimiento**

Las pupas deben provenir de un lote destinado a ser liberado. Se debe tomar una muestra aleatoria de aproximadamente 600-800 pupas irradiadas para asegurar obtener pupas de todas

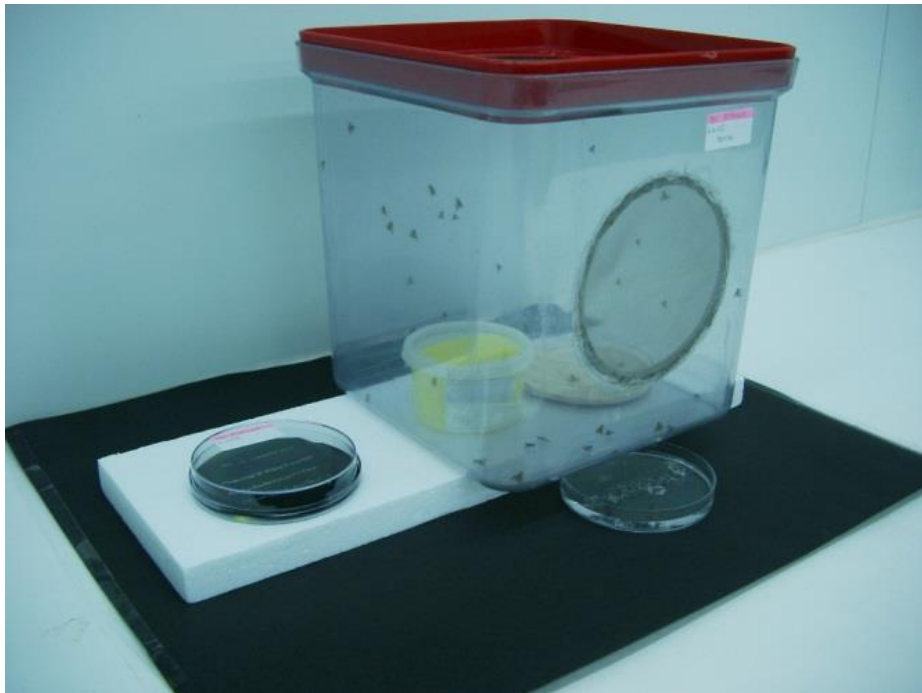
las posiciones en el recipiente. Se debe separar otra muestra de la misma cantidad de pupas no irradiadas.

Las moscas irradiadas y no irradiadas se separan por sexo varias horas antes de la emergencia. Cincuenta machos y 50 hembras (o más, si es posible) se transfieren usando un aspirador o una bomba de succión a cada una de las tres jaulas de prueba. Se configura una jaula para cada combinación de sexo y tratamiento de irradiación:

- 1.) Macho no irradiado x hembra no irradiada (control)
- 2.) Macho irradiado x hembra no irradiada (prueba de esterilidad del macho)
- 3.) Macho no irradiado x hembra irradiada female (prueba de esterilidad de la hembra)

En el caso de cepas sexadas genéticamente, la prueba de esterilidad de las hembras no es necesaria.

Las moscas reciben alimento y agua *ad libitum* durante la duración de la prueba. Después de varios días (dependiendo de la especie, por ejemplo, 4-5 días para *C. capitata*) las moscas maduran sexualmente y comienzan a aparearse. Cuando las hembras se acercan a la edad en que comienza la oviposición, se les proporciona un sustrato de oviposición que es apropiado para la especie y la cepa y de la que se pueden extraer los huevos fácilmente. Si las hembras ovipositan a través de una tela o pantalla, una sección en un lado de la jaula de prueba puede reemplazarse con una pantalla y colocar una caja de Petri con agua debajo para atrapar los huevos (**Figura 6.1**).



**Figura 6.1** Montaje para pruebas de esterilidad. La jaula (20 x 20 x 20 cm) debe tener en la tapa una fina malla de acero inoxidable para ventilación y en la cara frontal una pantalla para la oviposición. Se provee a los insectos de agua sobre una esponja empapada y alimento para adultos (mezcla de hidrolizado de azúcar y levadura). Los huevos caen al agua en la caja de Petri debajo de la malla y se alinean sobre papel de filtro negro húmedo para determinar la eclosión.

Los primeros huevos producidos deben descartarse ya que no todas las hembras pueden haberse apareado. Aproximadamente desde el quinto o sexto día (para la mosca del Mediterráneo), los huevos deben recogerse diariamente de cada una de las jaulas y alinearse en papel de filtro húmedo en cajas Petri. Se deben recolectar un mínimo de 100 huevos en buen estado (no deshidratados, manchados, transparentes o dañados) de cada jaula durante cinco días consecutivos. Las cajas Petri cubiertas se mantienen hasta cinco días hasta que se completa la eclosión. El número de huevos eclosionados y no eclosionados se cuenta y registra en el formulario apropiado (sección 9.6 Formulario de Evaluación de Esterilidad).

Para las pruebas de rutina, el número mínimo de huevos a recolectar es de 500; sin embargo, para un estudio de esterilidad más detallado se requiere un mayor número de huevos (> 3000).

### **Interpretación**

El grado de esterilidad requerido depende de las necesidades del programa (supresión, erradicación o liberaciones preventivas), y generalmente representa una compensación entre los objetivos en conflicto de alta esterilidad y máxima competitividad. Cualquier producción de huevos por parte de hembras que fueron irradiadas a los niveles utilizados para la esterilización en los programas TIE indica un problema con el proceso de irradiación o en la edad de las pupas irradiadas. La eclosión en cruza de machos no irradiados x hembras no irradiadas (control) debe ser típica de lo que se ve en la planta de cría. Los resultados en cruza que involucran moscas irradiadas deben corresponder a la solicitada por el usuario final. Cualquier aumento en la fertilidad indica que los procedimientos de irradiación deben ser verificados.

## **6.2. Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo**

### **Objetivo**

Observar las interacciones y el comportamiento de cópula durante el tiempo de actividad sexual de moscas maduras pero vírgenes entre una población silvestre y la cepa que se utilizará en el programa, para determinar si el comportamiento sexual de las moscas de cría es similar al de la población silvestre.

### **Objetivos específicos**

#### ***a) Evaluar la competitividad sexual del macho estéril:***

Determinar la capacidad de los machos estériles para competir con machos silvestres por apareamientos con hembras silvestres bajo condiciones de campo semi-controladas.

#### ***b) Evaluar la compatibilidad sexual entre dos muestras de moscas de origen diferentes:***

Determinar el grado de compatibilidad sexual entre dos poblaciones / cepas de moscas en condiciones de campo semi-controladas, generalmente una cepa de cría masiva y una de población silvestre.

#### ***c) Incrementar la información sobre el comportamiento sexual de moscas de la fruta:***

Para comprender las fallas en el desempeño sexual de los machos estériles y determinar las formas de mejorar el conocimiento del comportamiento sexual de las moscas en condiciones de campo semi-controladas, por ejemplo: tiempo, ubicación y agregación de machos "llamando", interacciones entre machos, cortejo y rechazo de las hembras, efecto de los potenciadores masculinos, periodicidad de apareamiento del macho, frecuencia de recópula de

la hembra, o competitividad de los machos en función de la eclosión del huevo (conocida como la prueba de Fried). Los procedimientos de estas evaluaciones opcionales se describen en Pruebas auxiliares (Capítulo 7).

**La prueba se desarrolla una vez al año con 10 repeticiones**

<b>Material biológico</b>	<b>Equipo</b>	<b>Procedimientos</b>
Machos y hembras silvestres	Aspirador jaula	<p><b>Ejecuta la prueba una vez al año (10 repeticiones)</b></p> <p><b>Antes de la prueba</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Separa las moscas por sexo</li> <li>• Coloca machos y hembras en cuartos separados</li> <li>• Usa machos estériles del centro de liberación antes y / después de la liberación</li> <li>• Para moscas silvestres provee condiciones semejantes al campo</li> <li>• Marca las moscas</li> </ul> <p><b>Durante la prueba</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Libera los machos</li> <li>• Espera 15 minutos</li> <li>• Libera las hembras</li> <li>• Revisalos árboles cada 15 minutos por parejas copulando</li> <li>• Llena la forma con los datos requeridos (posición y tiempo de apareamiento para cada pareja)</li> <li>• Revisa hasta que las moscas se separen y registra el tiempo de separación.</li> </ul> <p><b>Después de la prueba</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recoge las moscas</li> <li>• Limpia la jaula</li> <li>• Lava los árboles</li> <li>• Estima los índices de desempeño de cópula</li> </ul>

**Razonamiento**

El éxito de la TIE se basa en la inducción de esterilidad en la población silvestre mediante la liberación de machos estériles. La evaluación de la calidad de los machos de cría, la selección de qué cepa debe transferirse a la cría masiva y el efecto de los potenciadores sexuales o cualquier otro suplemento proporcionado al macho antes de su liberación, se pueden evaluar en el desempeño de cópula de las Pruebas de Jaulas de Campo y Pruebas de Desempeño Sexual. El procedimiento general consiste en la liberación de moscas sexualmente maduras pero vírgenes en un ambiente seminatural confinado. Las moscas deben provenir de una población silvestre y de laboratorio que se utilizará en el programa de liberación, para observar su comportamiento de apareamiento e interacciones durante el tiempo de actividad sexual. Idealmente, la población silvestre debe provenir de la población objetivo del programa TIE o de una población geográficamente cercana, y la prueba debe realizarse en el mismo entorno donde se liberarán las moscas. Sin embargo, si bajo alguna circunstancia esto no se

puede lograr, como cuando no hay suficiente cantidad de moscas silvestres disponibles o en áreas libres de moscas de la fruta que realizan liberaciones preventivas. En esos casos, el uso de cepas silvestres (i.e., moscas colonizadas con menos de cinco generaciones en laboratorio y en condiciones relajadas, preferiblemente con fruta natural como sustrato larval), o realizar la prueba en otras áreas son las mejores soluciones. Las plantas de cría también pueden realizar esta prueba para garantizar la calidad de las moscas antes del envío a los centros de emergencia y liberación de moscas.

La prueba del desempeño de cópula en jaula de campo es un duro compromiso entre las condiciones de laboratorio y las costosas y poco prácticas observaciones de campo para evaluar el comportamiento de cópula de las moscas en condiciones seminaturales y, de ahí, inferir su comportamiento en la naturaleza. Aunque los procedimientos de la prueba de jaula de campo del desempeño de cópula están diseñados para responder preguntas sobre la competitividad del macho estéril y la compatibilidad sexual entre la cepa de laboratorio y la silvestre son en general similares, los objetivos específicos y la forma en que se analizan e interpretan los datos difiere, y es importante saber por qué y cuándo responder cada pregunta.

**La competitividad sexual de machos** se refiere principalmente a la facilidad con que las hembras silvestres aceptan machos estériles para copular en presencia de machos silvestres. Se demostró que los efectos de la cría artificial pueden provocar cambios en la colonia de cría que reducen la aceptabilidad de los machos estériles por las hembras silvestres, especialmente al acortar algunas secuencias del cortejo o al cambiar cualitativamente el patrón del comportamiento sexual. Para fines de investigación, se utilizan técnicas como la grabación de video en cámara lenta para detectar cambios en el comportamiento; sin embargo, en los programas de acción, el impacto de tales cambios en la competitividad sexual de los machos puede evaluarse de manera adecuada observando la capacidad de los machos estériles de competir con los silvestres por cópulas con hembras silvestres en condiciones de jaula de campo. Durante el curso de un programa de acción, la competitividad sexual de los machos estériles debe monitorearse periódicamente (i.e., una vez al año o mejor cada 6 meses). Cualquier disminución significativa en la competitividad debería conducir a estudios profundos y evaluaciones detalladas del comportamiento sexual de las moscas, para decidir si es apropiado cambiar los procedimientos de cría o reemplazar la cepa en cría masiva antes de que afecte negativamente la efectividad del programa TIE.

**La compatibilidad sexual** es el grado en que dos grupos de organismos, cuando están en contacto, tienden a aparearse al azar sin tener en cuenta su grupo de origen en lugar de aparearse selectivamente con miembros de su propio grupo. Para los programas de TIE, la compatibilidad sexual entre la población silvestre objetivo y la cepa de laboratorio que se utilizará para liberación debe medirse antes de iniciar cualquier operación a gran escala. En algunas especies tefrítidas, la incompatibilidad sexual podría revelar la presencia de poblaciones sexualmente aisladas y, en mayor medida, la presencia de especies crípticas previamente no detectadas. Durante el curso de un programa TIE, la compatibilidad sexual debe ser reevaluada siempre que una nueva cepa de laboratorio pueda reemplazar la existente.

El diseño estándar especificado aquí es una adaptación del diseño original basado en las conclusiones de cuatro grupos de científicos que participaron conjuntamente en cuatro Proyectos Coordinados de Investigación FAO / OIEA (CRP), uno sobre el comportamiento de



apareamiento de la mosca del Mediterráneo (1994-1999), otro sobre el aseguramiento de la calidad de las moscas producidas y liberadas en masa (1999-2004), otro sobre la mejora del desempeño de los machos estériles (2004-2009), y otro sobre la resolución de los complejos de especies crípticas (2010-2015) y de los cuales hay disponibles varias publicaciones. Tal como está diseñada, la Prueba del Desempeño de Cópula en Jaula de Campo genera índices simples, reproducibles y significativos de la competitividad sexual de los machos y la compatibilidad sexual que se pueden usar para rastrear el desempeño de los machos estériles y hacer comparaciones entre cepas y otros tratamientos de cría y manejo. Si bien hay otras versiones de las pruebas de jaula de campo disponibles y útiles en particular para fines de investigación, una de las principales conclusiones de estos CRP fue que el estado nutricional, la proporción de sexos y la densidad de moscas en relación con la superficie del dosel en la jaula de campo influyen en los resultados de la prueba. Por esta razón, se deben hacer esfuerzos para seguir estrictamente los procedimientos descritos a continuación a fin de minimizar el impacto de estas variables en los resultados y así permitir comparaciones entre diferentes plantas y programas de acción.

### **Fuente y manejo de moscas**

#### **a) Moscas silvestres:**

Las moscas silvestres deben colectarse en campo de fruta infestada; típicamente, del principal hospedante de fruta disponible en la región. Las frutas se colocan en bandejas o bastidores de malla ancha sobre un sustrato de pupación como arena. El sustrato se tamiza cada 2-3 días y se recogen las pupas. Luego, las pupas se colocan en una jaula de malla o de plexiglás que se usa para "Pruebas de emergencia y habilidad de vuelo" con agua y alimento. El alimento debe parecerse a lo que las moscas obtienen en la naturaleza, siendo una posibilidad una fruta abierta y una fuente de proteínas. Estudios recientes han mostrado que varias especies pueden equilibrar su ingesta de nutrientes de diferentes fuentes de alimentos, por lo que se recomienda ofrecerles dos fuentes de alimentos, como un higo abierto más una fuente de proteínas (como el azúcar 3: 1 estándar: hidrolizado levadura). Usar altas proporciones de azúcar: proteína también puede ser una buena elección. A las pocas horas de emergencia del adulto, se seleccionan solo adultos voladores y se separan los sexos, preferiblemente con un aspirador. Las moscas se colocan en jaulas de laboratorio (de malla o plexiglás) con una densidad de  $30 \pm 10$  moscas por litro de volumen para el caso de *C. capitata* y preferiblemente menos para moscas más grandes como algunas *Anastrepha* o *Bactrocera* spp. ( $20 \pm 5$  moscas por litro de volumen), el sexado tiene que ser 100% efectivo. Las jaulas con hembras en las que se detecta un solo macho no se pueden usar para las pruebas y deben descartarse, y lo mismo se recomienda para las jaulas de machos en las que una hembra haya aparecido. Por esta razón, es mejor usar muchas jaulas pequeñas (i.e., de 1 L) en lugar de una sola jaula grande con todas las moscas que habrían sido sexadas. También se recomienda tener más moscas que las requeridas en el momento de la prueba. Las moscas se mantienen según el día de emergencia con agua y alimento hasta que maduren sexualmente. Dado que la edad de madurez sexual varía según la especie y el origen geográfico, se pueden requerir pruebas preliminares para determinar la edad apropiada de algunas especies aún no conocidas; para otras hay datos suficientes (ver **Cuadro 6.1**). Aunque las moscas deben ser sexualmente maduras, también se debe considerar que las moscas que ya hayan pasado su edad "normal" de apareamiento no pueden usarse, porque las hembras silvestres no apareadas, a medida que

envejecen, pueden estar cada vez más dispuestas a aceptar machos menos óptimos para copular. Durante el tiempo de maduración sexual, las jaulas pueden mantenerse en interiores a temperatura ambiente (alrededor de 25 °C) con un ciclo de 14:10 L: O. Se pueden obtener los mejores resultados manteniendo las moscas al aire libre en un lugar sombreado y protegido (por ejemplo, un insectario) cerca de donde se realizarán las pruebas. En cualquier caso, las temperaturas y la humedad moderadas, el agua limpia (la mecha de algodón se cambia regularmente) y la rotación diaria de luz en las jaulas deben mantenerse para promover la sobrevivencia y limitar el estrés innecesario.

**b) Moscas estériles:**

Las pupas deben provenir de una planta de cría masiva y después se siguen los procedimientos que normalmente se usan para la liberación de machos estériles. Solo en evaluaciones particulares se deben usar pupas provenientes de otras instancias, tales como de la colonia de filtros. Se colocan varios miles de pupas marcadas e irradiadas en los dispositivos usados para las "Pruebas de emergencia y habilidad de vuelo" como se hizo para las moscas silvestres siguiendo los mismos procedimientos. A las pocas horas de la emergencia del adulto, se seleccionan solo adultos voladores y se separan los sexos. Hay que asegurar que la clasificación por sexo sea 100% efectiva. SE mantienen las moscas según el día de emergencia en jaulas de laboratorio con agua y la misma comida que se les proporciona antes de liberarlas en los programas operativos. Durante el período de maduración sexual, las moscas se tratarán como en el centro de emergencia y liberación. Se debe considerar cualquier aspecto que tenga lugar durante la etapa de precondicionamiento / liberación, como el uso de sustancias de maduración sexual (i.e., metopreno), potenciadores sexuales (GRO o metil eugenol), enfriamiento antes de la liberación aérea, etc.

Si la prueba se va a desarrollar en el centro de emergencia y liberación de moscas, es recomendable tomar las moscas directamente de las que se van a liberar. Si se elige esto, se debe permitir que las moscas alcancen la edad de plena maduración sexual (**Cuadro 6.1**) y, en el caso de las cepas bisexuales, las hembras deben separarse poco después de la emergencia, o al menos a la edad en que se liberan las moscas. Si los sexos se mantienen juntos y alcanzan la maduración sexual, los machos agotarán su carga de esperma antes de ser evaluados en la jaula de campo.

**Cuadro 6.1** Edad mínima recomendada de la mosca (días) para realizar las pruebas de jaula de campo según la especie de mosca de la fruta.

<b>Especies</b>	<b>Moscas silvestres</b>	<b>Moscas de cría masiva</b>
<i>Ceratitis capitata</i>	7-10	4-6
<i>Anastrepha ludens</i>	16- 21	10-15
<i>Anastrepha obliqua</i>	15-17	8-10
<i>Anastrepha fraterculus</i>	15-20	10-15
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	30	10
<i>Bactrocera dorsalis</i>	25-30	10-15
<i>Bactrocera tryoni</i>	20	10

**c) Moscas fértiles de cría masiva:**

Para el caso de la evaluación de compatibilidad de cópula, las moscas de laboratorio deben evaluarse fértiles para eliminar cualquier impacto de la esterilización que pueda resultar en una reducción de los apareamientos heterotípicos. Los procedimientos para manejar pupas, sexado de moscas y el alimento de adultos deben ser iguales a los descritos arriba. Para fines de compatibilidad, la dieta de los adultos debe ser la misma para las moscas silvestre y de cría masiva.

**Condiciones de confinamiento:** Durante el tiempo de la maduración sexual, los sexos deben ser separados en cuartos separados.

**Nota sobre el tipo de alimento para proporcionar a las moscas:** la selección del alimento adecuado para proporcionar a las moscas es crucial para el resultado de la prueba. Se ha demostrado que el alimento para adultos afecta la competitividad sexual de los machos en varios aspectos. En particular, los machos que ingieren proteínas como adultos tienen varias ventajas sexuales sobre aquellos que se alimentan solo de dietas basadas en azúcar. Se ha recomendado a los centros proporcionar algo de proteína en la dieta previa a la liberación y esto ha sido adoptado en algunos de ellos. También se ha demostrado que los machos estériles de algunas especies pueden encontrar y explotar fuentes de carbohidratos en la naturaleza, y que aquellos alimentados con proteínas antes de su liberación permanecen con un contenido de proteínas más alto durante los primeros días en el campo en comparación con machos que fueron privados de proteínas en su dieta previa a la liberación. También se ha demostrado que la proteína puede ser perjudicial y reducir la longevidad. Estudios recientes proporcionan evidencia de que no es la proteína en sí misma sino el exceso de proteína lo que afecta la sobrevivencia. En general, la evidencia muestra que la ingestión de proteínas proporciona ventajas sexuales y que el impacto perjudicial puede revertirse ajustando la relación azúcar: proteína. Es importante entonces que el alimento que recibirán las moscas antes de ser liberadas en la jaula se parezca a lo que realmente recibirán en los procedimientos operativos. Pero se puede argumentar que los machos estériles antes de unirse a los leks pueden buscar nutrientes adicionales si es necesario. Por lo tanto, en aquellos programas en los que no se agrega proteína a la dieta previa a la liberación, las moscas estériles deben recibir alguna fuente de proteínas (e.g., el mismo alimento de las moscas silvestres) uno o dos días antes de que se realicen las pruebas de jaula de campo. En estos casos, se recomienda ampliamente se realicen más estudios para evaluar el impacto de agregar una fuente de proteínas en la competitividad de las moscas.

**Equipo**

- Todo el equipo necesario para mantener a las moscas en el laboratorio desde la emergencia hasta su liberación en la jaula de campo: jaulas de plexiglás con dispositivos de "habilidad de vuelo", aspiradores para atrapar a las moscas, contenedores de 1 L, contenedores de agua y alimento, etc.
- Todo el equipo necesario para marcar las moscas según la técnica elegida (ver más abajo): (1) polvo fluorescente; (2) pintura a base de agua, pinceles finos y suaves de pelo de camello y una bolsa de malla; (3) colorantes alimenticios para teñir la dieta (i.e., que se usan con fines culinarios).

- Jaula de campo al aire libre, de 2 m de alto por 2,9 m de diámetro, con una planta que llena una gran parte del volumen de la jaula (**Figura 6.2**). Idealmente, la planta debe estar enraizada en el suelo, pero las plantas en macetas pueden ser suficientes si no hay disponibilidad de plantas enraizadas, las cuales pueden ser plantas hospedantes de las especies de moscas a evaluar (cítricos, guayabas, etc.). Los árboles artificiales también pueden ser una opción y tienen la ventaja de que las moscas no están expuestas a los volátiles de las plantas que alteran el comportamiento de las moscas. El follaje disponible debe proporcionar un sustrato abundante para el comportamiento de apareamiento, pero podría podarse ligeramente (si necesario) para que las moscas sean visibles para el observador. Debe estar disponible un promedio de 20 hojas de tamaño mediano por mosca liberada en la jaula de campo. Si hay suficiente follaje y luz dentro de las jaulas y no se liberan más de 150-200 moscas por jaula (independientemente del tipo de prueba en jaula de campo), se debe realizar poca o ninguna actividad de cópula en la malla de la jaula.



**Figura 6.2** Jaula de campo estándar utilizada para pruebas de desempeño de cópula.

- Mechales de algodón dental impregnadas con agua para colocar en los árboles como fuente de agua para las moscas.
- Viales de píldoras de plástico o recipientes similares de aproximadamente 10-20 ml, preferiblemente transparentes, para recoger las parejas en cópula (dependiendo de la cantidad de moscas liberadas, 50-80 por jaula).
- Lápices de grasa y / o cinta adhesiva y bolígrafos para marcar viales.
- Formularios de registro de datos con lápiz.
- Hidrotermómetro, luxómetro o registrador automático de datos.
- Lámpara ultravioleta de onda larga (las moscas no deben estar marcadas con pintura y ser identificadas solo por la presencia de polvo fluorescente), o microscopio fluorescente.

## Procedimientos

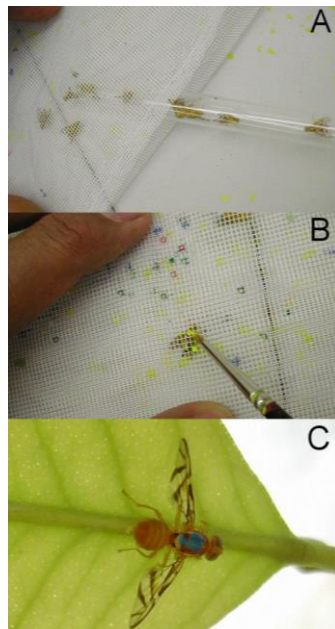
Antes de liberar las moscas en las jaulas, será necesario marcarlas para distinguir a qué cepa / población pertenecen. Tres metodologías se usan ampliamente y se pueden aplicar según convenga incluso en conjunto:

- (1) marcado con polvo fluorescente como en los programas operativos
- (2) pintar las moscas en el tórax con pintura a base de agua o,
- (3) proporcionar a las moscas alimento teñido con colorante alimenticio no tóxico.

Cada técnica se aplica en diferentes momentos. En el caso del polvo fluorescente, el pintado ocurre en la etapa de la pupa antes de la aparición del adulto con aproximadamente 1.5 g por litro de pupas, los procedimientos son los explicados en la sección 3.2 Procedimientos previos a la irradiación.

En el caso de pintar el tórax, al menos 24 a 48 horas antes de la prueba, las moscas se marcan individualmente aplicando un pequeño punto de pintura en la superficie dorsal del tórax. Para ello hay que inmovilizar las moscas colocándolas en una bolsa hecha de mosquitera (malla 18) y sosteniendo la malla suavemente alrededor de cada mosca, una a la vez. Se usa un cepillo de pelo de camello delgado y suave para aplicar una pequeña gota de pintura sobre la mosca (**Figura 6.3**).

Para el caso de agregar el colorante a la dieta, es recomendable hacerlo desde la emergencia de adultos. Se agrega colorante alimenticio no tóxico al alimento para adultos para obtener el mismo alimento con diferentes colores. Las moscas que ingieren la comida tendrán su abdomen coloreado con el color proporcionado como se ilustra en la **Figura 6.4**. Esta técnica de marcado ha demostrado ser confiable para *C. capitata* y varias especies de *Anastrepha* y reduce el manejo de la mosca en comparación con la técnica que consiste en pintar el tórax.



**Figura 6.3** Procedimiento para marcar individuos adultos tefrítidos con pintura a base de agua. (A) los adultos son transportados suavemente del aspirador a una bolsa; (B) la bolsa se estira para inmovilizar la mosca y una gota de pintura se coloca en el notum; (C) el resultado: un macho marcado de *Anastrepha fraterculus* llamando en una jaula de campo.

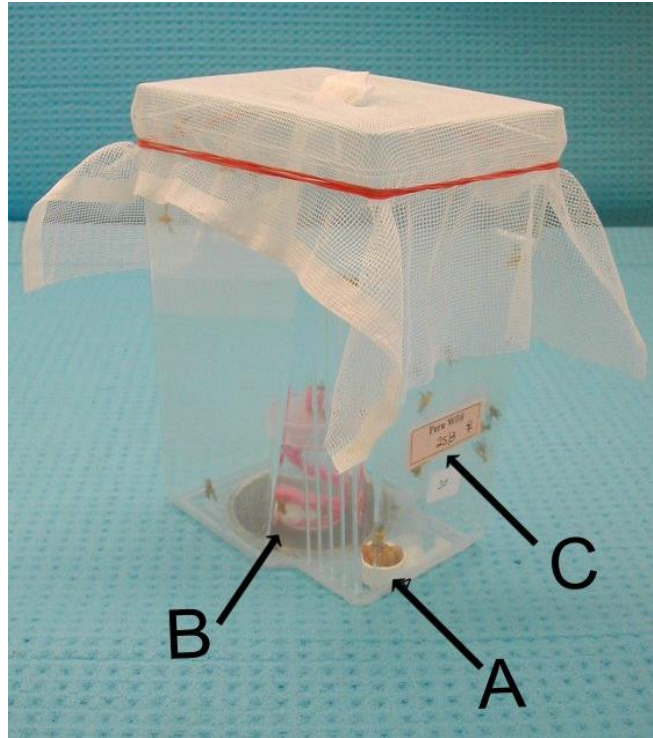


**Figura 6.4** Moscas marcadas con alimento coloreado no tóxico.

A pesar de que el marcado de moscas con pintura a base de agua o colorantes alimenticios parece no tener ningún efecto en los resultados de las pruebas de campo de desempeño sexual, los colores utilizados para marcar las cepas deben intercambiarse al azar entre las réplicas y las marcas de pinturas o colorantes podrían evaluarse con anticipación para asegurarse de que la marca no afecte el comportamiento de la mosca o la sobrevivencia.

Inmediatamente después del marcado, las moscas se transfieren a contenedores adecuados para liberarlas en las jaulas de campo con agua y alimento en grupos de 25-50 moscas, según la especie, por contenedor de 1 litro (**Figura 6.5**).

El día de la prueba, los machos silvestres y estériles se liberan en una jaula de malla y se les da un tiempo (e.g., 15-30 min) para dispersarse y establecer territorios. El número de moscas que se liberan depende de la especie; para el caso de la mosca del Mediterráneo normalmente se liberan 50 moscas de cada cepa y sexo, lo que totaliza 200 moscas por jaula (cuando se liberan machos y hembras de laboratorio), o 150 moscas (cuando se liberan solo machos de la cepa sexada. Para el caso de las especies *Anastrepha* o *Bactrocera*, el número es de alrededor de 25-30 moscas por sexo y origen. El tiempo de liberación debe preceder al tiempo de pico de actividad de apareamiento para la especie. Por ejemplo, los adultos de *C. capitata* y *A. fraterculus* generalmente se liberan al amanecer; mientras que para *B. dorsalis* las pruebas se realizan al anochecer. Las moscas deben salir del contenedor solas y no obligadas a hacerlo sacudiendo el contenedor o empujando las moscas hacia afuera. Las moscas que quedan dentro del contenedor aparentemente incapaces de volar deben reemplazarse para mantener la cantidad requerida de moscas "normales" por cepa y sexo. Después de 15-30 minutos de aclimatación de los machos, se liberan las hembras.



**Figura 6.5** El contenedor suele contener las moscas después del marcado individual y antes de soltarlas en la jaula de campo. A: alimento, B: agua; C: etiqueta que menciona la cepa, el sexo y el número de adultos.

Después de la liberación de las hembras, los observadores deben examinar el árbol buscando parejas en cópula. Esto se puede hacer continuamente o se puede hacer un censo de parejas de apareamiento con cierta frecuencia. La frecuencia del censo debe ser de alrededor de 15 minutos y puede ser mayor solo en aquellos casos en los que la duración del apareamiento es superior a una hora. Las parejas en cópula se capturan individualmente en los viales, procurando obtener solo un par por vial (**Figura 6.6**). Hay que mirar al par cuidadosamente para confirmar que se está llevando a cabo la cópula; los machos a veces montan a la hembra durante cierto tiempo hasta que comienza la cópula. También puede suceder que los machos a veces monten a otros machos que se asemejan a una pareja de apareamiento. Si durante este procedimiento pierde una mosca de un par, suelte la otra. Si tiene tres moscas, retire la mosca extra (generalmente macho). No ponga dos pares en el mismo vial.

Se anota en el formulario el tipo de macho y hembra, el momento en que se capturaron las parejas y la posición en el árbol (altura, sustrato, etc.). Se etiqueta el vial indicando el número asignado a la jaula de campo en la que se realizó el apareamiento (si se ejecuta más de una jaula en un día determinado), el día de la prueba y el número del pareja de apareamiento (las parejas deben estar numeradas en el orden en que se recojan en una jaula dada, comenzando desde 1, para el primer par de apareamiento). Esto es extremadamente crítico y se debe prestar atención para no mezclar los pares de cópula, especialmente si se usarán en pruebas complementarias o si las moscas están marcadas con polvo fluorescente. En este caso, la identificación de la cepa tendrá lugar más tarde bajo la lámpara UV o el microscopio fluorescente. Asegúrese de que los viales se mantengan a la sombra para minimizar el estrés térmico o de otro tipo para las moscas hasta que la pareja se suelte. Se anota en la forma el tiempo en que termina el apareamiento.



**Figura 6.6** Colecta de un par en cópula de *Anastrepha fraterculus* durante la prueba de campo de desempeño de cópula.

La prueba debe continuar hasta que el período natural de apareamiento máximo para esa especie en condiciones locales haya terminado. En ausencia de dicha información, la prueba debe cubrir la mayor parte del día. Una vez finalizada la prueba, con la ayuda de un aspirador, se retiran las moscas que no se aparearon de la jaula. Es aconsejable lavar el árbol para ayudar a eliminar cualquier señal química dejada por las moscas si la jaula se va a utilizar en los días siguientes o consecutivos.

Idealmente, las pruebas deben ejecutarse "a ciegas"; es decir, el personal que realiza la prueba no debe saber qué color de marca corresponde a las moscas silvestres o estériles.

**Nota sobre el reemplazo de moscas apareadas:** aunque se ha propuesto que una vez que se retira una pareja de la jaula, es deseable liberar otra pareja del mismo origen para que las proporciones de moscas permanezcan constantes, esto puede ser impráctico en algunos casos pues se requieren más moscas. Una solución adecuada es no extender la prueba en situaciones en las que más del 75% de las moscas se aparearon. Nuevamente, la decisión de eliminar algunas parejas del análisis se recomienda una vez que se recopilieron todos datos y no mientras se ejecuta la prueba.

**Nota sobre la prueba de jaula de campo de desempeño de cópula de cepas de sexado genético (CSG):** si se va a evaluar la compatibilidad de apareamiento de una cepa termo sensible letal *tsl* CSG, utilice 50 hembras del stock de la colonia de cría (sin tratamiento térmico). Los datos de esas pruebas podrían no ser confiables si las temperaturas dentro de la jaula de campo son superiores a 27 °C, por lo que se debe tener especial cuidado si se realiza en esas condiciones. En caso de evaluar la competitividad sexual de machos de cualquier CSG, no es necesario liberar hembras de laboratorio en la jaula.



**Nota sobre la adición de potenciadores sexuales:** como se indicó anteriormente, el objetivo principal de la Prueba de desempeño de cópula en jaula de campo es evaluar el comportamiento sexual del macho estéril en una situación que se asemeja a lo que sucede en la naturaleza. De esta manera, los potenciadores sexuales deben agregarse solo si el programa de acción los usa de manera rutinaria.

### **Interpretación**

Se han desarrollado varios índices para cuantificar el desempeño sexual de las moscas, incluida la competitividad y la compatibilidad. Para cada jaula, se calcula el número de cópulas en cada una de las cuatro categorías posibles (machos estériles con hembras estériles (EE); machos estériles con hembras silvestres (ES); machos silvestres con hembras silvestres (SS); y machos silvestres con hembras estériles (SE), o de las dos categorías (ES y SS) en caso de que se desarrolle la prueba de campo de desempeño de cópula para la cepa SG. El análisis de resultados de la prueba debe implicar el uso de los principales índices disponibles y es aconsejable incluir el análisis de bondad de ajuste  $\chi^2$  para evaluar estadísticamente cualquier desviación significativa del apareamiento aleatorio. También deben presentarse en forma gráfica como se muestra a continuación para cada índice. Para obtener datos significativos, la prueba de jaula de campo de desempeño de cópula idealmente debe incluir un total de 10-15 réplicas durante 5-10 días con al menos 6-10 lotes diferentes de moscas estériles. Réplicas adicionales pueden ser deseables pero innecesarias si la variabilidad entre las réplicas es baja.

**Proporción de Cópulas (PC):** lo primero que debe observarse es si las moscas se aparearon durante las pruebas de jaula de campo al estimar la proporción de cópulas. La PC mide la idoneidad de las moscas y del ambiente para el apareamiento y se define como:

$$PC = \frac{\text{No. de parejas colectadas}}{\text{No. de hembras liberadas}}$$

El porcentaje promedio de cópula proporciona una indicación útil de la propensión a la cópula. Por ejemplo, en *C. capitata*, la propensión a la cópula se considera adecuada cuando el 50% de las moscas de todas las combinaciones de cepa y sexo participaron en el apareamiento. En la práctica, las moscas de algunas cepas silvestres (especialmente las hembras) son más reacias que las hembras estériles a aparearse en jaulas de campo. En cualquier caso, los datos de una jaula deben descartarse si menos del 20% de los machos y las hembras de cualquier cepa participan en las cópulas.

También puede suceder que un número significativo de cópulas tenga lugar en la malla de la jaula en lugar de en el árbol. Si las réplicas de la prueba tienen más del 25% de moscas silvestres en la malla pueden reflejar condiciones ambientales inadecuadas (como luz insuficiente, falta de agua, hojas, etc.) y, por lo tanto, deben repetirse. Hay consenso de que condiciones ambientales adecuadas dentro de una jaula de campo se reflejan en moscas silvestres que prefieren la copa de los árboles. Si se produce más de una pequeña proporción de actividad de apareamiento en la malla, se debe ajustar el sombreado de la jaula para corregir esta situación. Además, se recomienda que las parejas recogidas fuera del árbol no se incluyan en el análisis de datos. Sin embargo, esta afirmación debe tomarse con precaución en

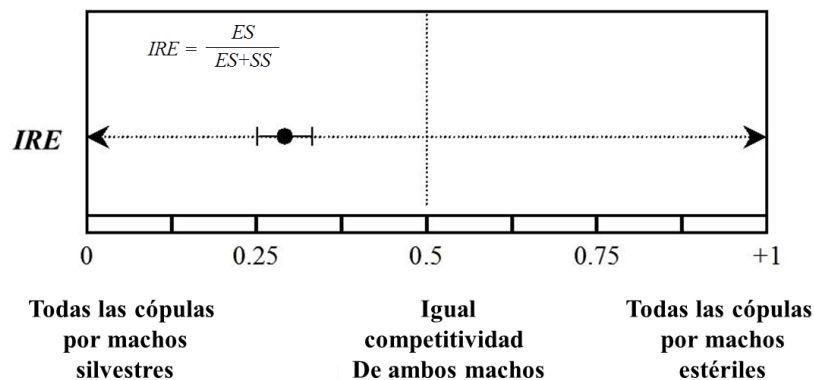
las pruebas de compatibilidad dado que la aparición de leks y cópulas en la malla de la jaula, también puede reflejar algún tipo de aislamiento espacial (i.e., ecológico). Por esta razón, se recomienda registrar cualquier información durante la prueba y evaluarla cuidadosamente durante el análisis de datos.

**Índice Relativo de Esterilidad (IRE):** El IRE es el mayor índice para cuantificar la competitividad sexual de machos, como lo representa la fórmula:

$$IRE = \frac{ES}{ES+SS}$$

Los valores de IRE pueden variar de 0 a 1, donde 0 indica que todas las hembras silvestres que se aparearon en la jaula lo hicieron con machos silvestres, 1 indica que todas las hembras se aparearon con machos estériles, y 0.5 indica que la mitad se apareó con machos estériles y la mitad con machos silvestres, y que los machos estériles son igualmente competitivos que los silvestres (**Figura 6.7**). Para *C. capitata*, un IRE medio de menos de 0,20 en una jaula con una proporción 1: 1 de (E:S) es motivo de preocupación por la competitividad de los machos estériles.

Cuando la relación liberada difiere de 1:1, entonces se debe ajustar el IRE esperado para comparar. Por ejemplo, si la proporción liberada es 2: 1, estéril: silvestre, entonces el IRE esperado (donde la competitividad es igual para machos estériles y silvestres) es 2/3 o 0.667; si es 3: 1 estéril: silvestre, entonces el IRE esperado es 3/4 o 0.75, y así sucesivamente. Luego, al comparar el IRE observado y el esperado, es posible determinar la competitividad real de los machos estériles.



**Figura 6.7:** Representación gráfica del Índice Relativo de esterilidad (IRE). El valor representado (media ± ee) se obtuvo de la comparación entre moscas silvestres y estériles de *Anastrepha ludens* en jaulas de campo (después de Hernández *et al.* 2003).

**Índice de competitividad basado en el IRE (CIRE):** El CIRE es una alternativa para tener una idea de la competitividad del macho estéril en relación con la del macho silvestre y está representado por la fórmula:

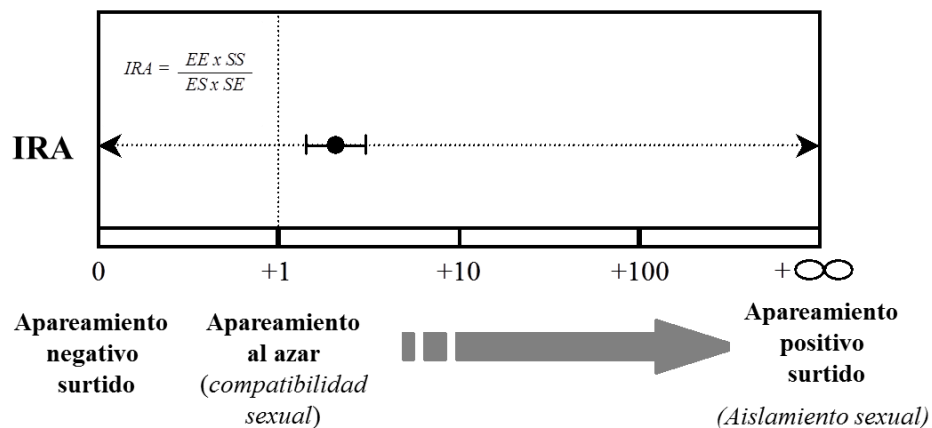
$$CIRE = \frac{IRE}{1-IRE}$$

Este índice compara la proporción de cópulas de machos estériles con la proporción de cópulas de machos silvestres, y en los casos en que se libera el mismo número de machos estériles y silvestres en la jaula; el CIRE esperado es 1.0 si la competitividad de machos estériles es igual a la de los machos silvestres.

**Índice Relativo de Aislamiento (IRA):** El IRA es una medida de la compatibilidad de apareamiento entre dos cepas es una medida de la compatibilidad de cópula entre dos cepas.

$$IRA = \frac{EE \times SS}{ES \times SE}$$

Los valores de 1 indican apareamiento aleatorio entre cepas, lo cual es deseable en términos de aplicación de la TIE; valores superiores a uno indican apareamiento positivo sesgado, es decir, los machos de laboratorio tienden a aparearse solo con hembras de laboratorio y viceversa (**Figura 6.8**).



**Figura 6.8** Representación gráfica del Índice Relativo de Aislamiento (IRA). El valor que se muestra (media ± ee) se obtuvo de la comparación entre moscas silvestres y estériles de *Ceratitis capitata* en jaulas de campo.

El IRA tiene algunas ventajas sobre otros índices de compatibilidad. Por ejemplo, es más sensible a las caídas en un solo tipo de apareamiento, lo cual es el de mayor preocupación para los gerentes de programas TIE. Además, el IRA no se ve afectado por el nivel de participación de los diferentes tipos de moscas, sino solo por quienes eligieron aparearse. Del mismo modo, un IRA de 1 indica apareamiento aleatorio independientemente de la relación E:S que se prueba en la jaula (normalmente, será 1: 1). Si se puede suponer que las hembras de laboratorio aceptan machos silvestres y de laboratorio por igual y que los machos silvestres y de laboratorio tienen la misma propensión a la cópula en campo abierto, entonces el IRA es igual al número de machos de laboratorio necesarios para igualar la capacidad de apareamiento de un macho silvestre en el campo; lo recíproco es el efecto de la compatibilidad de apareamiento en la competitividad general.

$$IRA = \frac{(EE + 1) \times (SS + 1)}{(ES + 1) \times (SE + 1)}$$

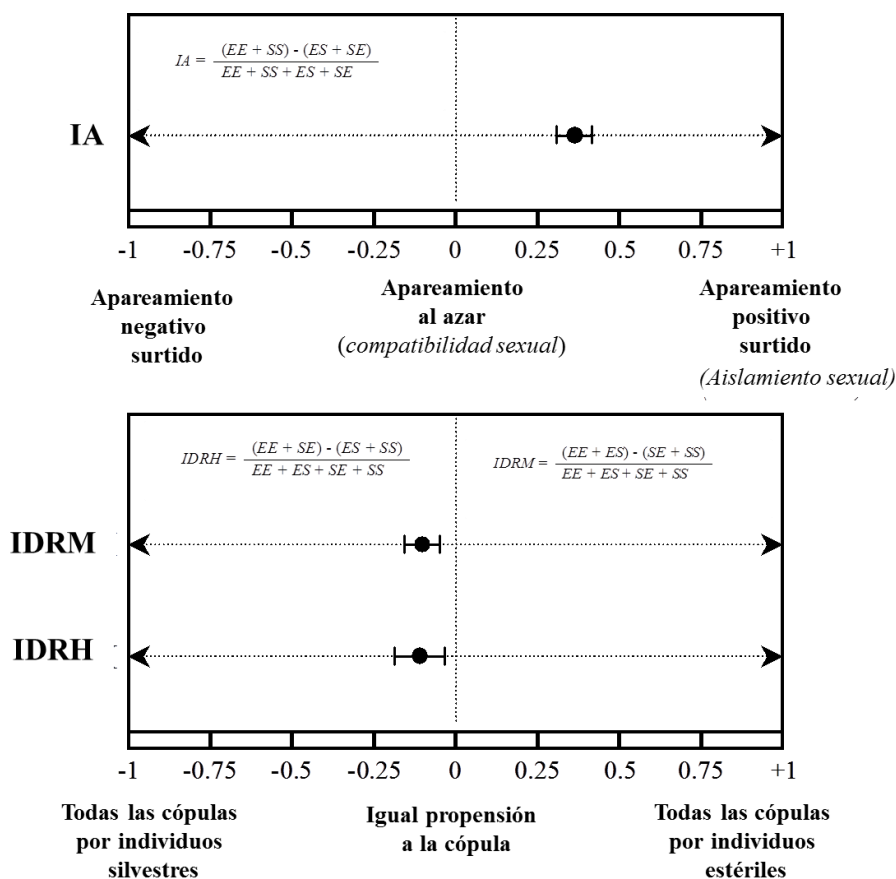
Pero el IRA también tiene algunas desventajas. Primero, no está definido si ES o SE son cero. En segundo lugar, cuando el número de apareamientos en cualquier categoría es pequeño, sumar o restar un solo apareamiento en esa categoría causará un gran cambio en el valor del índice. Tercero, puede ser difícil normalizar los datos si se analizan estadísticamente. Sin embargo, el primer inconveniente puede eliminarse si la fórmula se corrige agregando uno (1) a cada una de las cuatro combinaciones de apareamiento.

Los valores de IRA mayores a 1 indican que hay alguna diferencia en el comportamiento de cópula (en un sentido amplio) entre las moscas silvestres y las de laboratorio, lo que da como resultado que una o ambas cepas que tienden a aparearse de forma sesgada (i.e., con similares). Se ha encontrado que los valores de IRA que generan acciones correctivas varían entre especies, y que moscas silvestres de algunas áreas parecen producir consistentemente IRA más altos que moscas de otras áreas (usando las mismas cepas de laboratorio). Para *C. capitata*, el IRA promedia típicamente entre 1.5 a 5, pero en el caso de las moscas estériles de la cepa Hawaiana (Hi-Lab) de *C. capitata* "resistente" a la TIE en Kauai, el IRA alcanzó valores alrededor de 30. En general, los valores de IRA consistentemente mayores que 3 para *C. capitata*, sugieren que las plantas de cría deberían considerar cepas alternativas para la producción.

**Índice de Aislamiento (IA):** El IA es otra medida de la compatibilidad de cópula.

$$IA = \frac{(EE + SS) - (ES + SE)}{EE + SS + ES + SE}$$

Sus valores van desde -1 (apareamiento sesgado negativo completo; i.e., todos los apareamientos son con miembros de la cepa opuesta) hasta 0 (apareamiento aleatorio) a +1 (apareamiento sesgado positivo completo; aislamiento de apareamiento total de las dos cepas) (**Figura 6.9**). La principal ventaja de este índice es que, al variar de -1 a +1, es más fácil evaluar la desviación del valor esperado de 0 que con un índice que varía de 0 a infinito. En comparación con el IRA, IA no es tan sensible a un cambio en un solo apareamiento y siempre se puede definir, sean cuales fueran los valores de los 4 tipos de apareamiento. En general, los valores de IA consistentemente mayores que 0.5 sugieren que se produjo un apareamiento sesgado positivo (que debe explicarse analizando los valores de los índices que siguen) y que se debe considerar reemplazar las cepas.



**Figura 6.9** Representación gráfica del índice de aislamiento (IA) y de los índices de desempeño relativo de machos y hembras (IDRM y IDRH). Estos índices deben considerarse juntos para una mejor comprensión. El valor mostrado (media  $\pm$  ee) se obtuvo al comparar moscas silvestres y estériles de *Anastrepha ludens* en jaulas de campo (después de Hernández *et al.* 2003).

**Índice de Desempeño Relativo de Machos (IDRM).** El IDRM es una medida relativa de la propensión al apareamiento de machos estériles versus los silvestres.

$$IDRM = \frac{(EE + ES) - (SE + SS)}{EE + ES + SE + SS}$$

Un valor de 1 indica que todas las cópulas en la jaula fueron realizadas por machos de laboratorio, y -1 indica que todas las cópulas las realizaron los machos salvajes. Cero (0) indica que los machos silvestres y de laboratorio participaron igualmente en las cópulas (**Figura 6.9**). Además de IRA y CIRE, el IDRM se puede interpretar como una medida del desempeño del macho estéril. Los valores superiores a 0 indicarán un mejor desempeño del macho estéril y los valores siguientes a 0 indicarán un desempeño inferior que los machos silvestres que logran más apareamientos que los estériles.

**Índice de Desempeño Relativo de Hembras (IDRH):** El IDRH es la contraparte del IDRM y sirve como una medida de la propensión a la cópula de las hembras (**Figura 6.9**).

$$IDRH = \frac{(EE + SE) - (ES + SS)}{EE + ES + SE + SS}$$

El análisis conjunto de IA, IDRM y IDRH debe proporcionar una idea completa y confiable de la compatibilidad sexual entre cepas y, si se encuentra una desviación del estándar esperado, las razones por las que ocurrió. En general, al comparar una cepa criada en masa y una de población silvestre de *C. capitata*, los valores de IA oscilan entre 0.1 y 0.4, los valores de IDRH son valores positivos y los valores de IDRM son cercanos a 0. Estos datos muestran que, en tal caso, hay una ligera tendencia al apareamiento sesgado; es decir, las hembras criadas en masa son menos selectivas para aparearse que las hembras silvestres y puede parecer que ambos tipos de machos son igualmente competitivos para copular, independientemente del tipo de pareja. Los valores de ES que son bajos en comparación con otras combinaciones posibles sugieren que las hembras silvestres tienden a rechazar el cortejo de un alto porcentaje de machos de laboratorio. Los valores bajos de ES y SS pueden indicar inmadurez de las hembras silvestres. Los valores bajos de ES y SE sugieren una incompatibilidad general entre las cepas.

**Nota para el análisis basado en la prueba de jaula de campo del desempeño de cópula de cepas de sexado genético (CSG):** en el caso de CSG y las pruebas en las que las hembras de cría masiva no se liberan en la jaula, el MRPI no proporciona información adicional a la obtenida con el RSI.

### **Otras variables relacionadas con el comportamiento sexual del macho**

**Latencia (tiempo al inicio de la cópula):** el tiempo en el que las moscas de laboratorio (fértil o estéril) y las moscas silvestres inician sus actividades sexuales y se aparean, también es un buen parámetro para describir el comportamiento sexual, particularmente la preparación y competitividad de apareamiento, y esta variable ha sido útil para descubrir diferencias entre orígenes y / o desviaciones generadas en el laboratorio. Los valores se obtienen de los registrados en el formulario cuando las parejas se recolectaron en la jaula y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Latencia} = \text{Tiempo de inicio de la cópula} - \text{Hora del inicio de la prueba en jaula de campo}$$

Los valores de la media se calculan por separado para cada jaula y las comparaciones entre los tipos de apareamiento se pueden analizar mediante modelos mixtos (con origen macho y hembra como factores fijos y lote de moscas estériles, jaula y día de prueba como factores aleatorios).

**Duración del apareamiento:** el tiempo de permanencia en cópula puede ser una indicación de la adaptación de laboratorio de una cepa y puede estar relacionado con la transferencia de esperma y líquido de la glándula accesoria del macho a la hembra. Si bien la mayor duración del apareamiento en sí no debe considerarse como un indicador de la calidad del macho y la literatura muestra que no está vinculada específicamente en todas las especies al éxito reproductivo, es una forma útil de explorar las diferencias entre las cepas / poblaciones, y lo más interesante es descubrir posibles interacciones macho-hembra. En *C. capitata*, se ha observado que una duración excepcionalmente larga del apareamiento (> 3 horas) muy a menudo resulta en que no se transfiere esperma a la hembra. Sin embargo, se debe prestar atención si las cópulas con machos estériles son más cortos en comparación con los silvestres. Los machos de cría masiva tienden a tener tiempos de cópula reducidos en comparación con

los machos silvestres. Estos tiempos de cópula reducidos pueden estar asociados con una mayor tendencia de las hembras a la recópula.

En cuanto a la latencia para la cópula, la duración de la cópula se estima a partir de los datos registrados sobre el tiempo en que se recolectó la pareja y el tiempo en que se separan. Los valores de la media se calculan para cada jaula y las comparaciones se evalúan mediante modelos mixtos (con origen del macho y hembra como factores fijos y lote de moscas estériles, jaula y día de prueba como factores aleatorios).

***Ubicación del apareamiento:*** el lugar en el que se recogen las parejas es un indicador confiable de dónde los machos forman sus leks. A este respecto, el registro de esta variable es muy simple y, junto con el registro relacionado con el tiempo y la duración del apareamiento, completa el análisis en la prueba básica de desempeño sexual. Los datos se recopilan de los formularios en los que se ha registrado la posición de la pareja cuando se recogieron. Aunque se deben tener en cuenta varios aspectos, los más relevantes están relacionados con si la pareja se encontró en el árbol o en la malla de la jaula, la altura en la que se recolectó (generalmente la jaula se dividen en tres partes: superior, medio y bajo), la parte del árbol (lado superior de la hoja, debajo del lado de la hoja, tallo) y el cuadrante respectivo a los ejes cardinales (Norte, Este, Sur, Oeste). La frecuencia de cópulas que ocurren en cada ubicación se puede comparar mediante análisis de frecuencia y se sugiere ejecutar  $\chi^2$  análisis de homogeneidad.

### **Conclusiones finales**

Esta prueba, si se realiza periódicamente y cubre todos los aspectos necesarios para asemejarse a las condiciones de campo, monitoreará el desempeño sexual del macho estéril y dará un buen indicador de su competitividad sexual. Si el desempeño de cópula de los machos estériles con hembras silvestres es pobre o no es el esperado, será necesario realizar observaciones más detalladas durante la prueba de campo del desempeño de cópula o incluir pruebas complementarias para identificar la causa principal de la disminución de la compatibilidad y / o competitividad. Los procedimientos y la interpretación de estas observaciones y pruebas adicionales se presentan en la Sección de Pruebas auxiliares. Se recomienda encarecidamente realizar cualquiera de estas evaluaciones siempre que sea posible. La detección temprana de cualquier desviación del comportamiento normal ahorrará tiempo y recursos.

Además, se pueden realizar otras variaciones de la prueba de campo de desempeño de cópula si se considera necesario. Los ejemplos de posibles alternativas incluyen: relaciones inundativas (estéril: silvestre) (como se esperaría durante la mayoría de los programas TIE); uso de diferentes plantas hospedantes en macetas; uso de una proporción más alta de machos: hembras al liberar hembras lentamente con el tiempo (como se esperaría en los leks naturales en el campo). En este caso específico, se acordó durante el CRP de la FAO / OIEA sobre el comportamiento de cópula de la mosca del Mediterráneo, que una proporción de machos a hembras relevante para esta prueba no debe ser inferior a 3: 1. El uso de pruebas con diseños alternativos puede ser particularmente valioso para diagnosticar causas de niveles bajos de compatibilidad o competitividad sexual. Sin embargo, en aras de la fiabilidad, todas las pruebas de jaula de campo de cualquier tipo siempre deben incluir moscas silvestres como

control y no deben reemplazar el protocolo estándar, ya que impide las comparaciones de los resultados entre las plantas o los centros de emergencia y liberación.

### **6.3. Prueba de Liberación-Recaptura de Dispersión y Supervivencia**

#### **Objetivo**

Estimar la capacidad de los insectos estériles liberados para dispersarse y sobrevivir en el campo.

#### **Razonamiento**

La capacidad de las moscas estériles para sobrevivir y dispersarse en el campo hasta los lugares de alimentación, apareamiento y descanso es obviamente crítica para el éxito de los programas de TIE. Las pruebas de liberación-recaptura pueden usarse para evaluar tanto la supervivencia como la dispersión de las moscas. La prueba consiste en liberar moscas en un punto de liberación y establecer una rejilla de trampas alrededor de este punto. Las trampas se deben atender a intervalos regulares para anotar el número de moscas capturadas. Los datos de esta prueba son útiles para hacer comparaciones entre diferentes cepas, moscas de diferentes plantas y / o moscas que reciben diferentes procedimientos de cría o tratamientos previos a la liberación.

Además de evaluar la calidad de la mosca, un objetivo importante de esta prueba es determinar si con el protocolo de liberación utilizado en el programa operativo se cubre completamente el área del programa, tanto en términos de tiempo como de espacio. Los datos de esta prueba se pueden usar como base para ajustar los procedimientos operativos, como el intervalo de tiempo entre dos liberaciones en cualquier área determinada o la distancia entre las líneas de vuelo.

Durante el curso de los programas TIE, la prueba se debe realizar en un área con condiciones agroecológicas similares a los de la zona de liberación del programa. Como alternativa, la prueba se puede realizar dentro de la zona del programa si las moscas de la prueba están marcadas con un color diferente. Sin embargo, esta táctica requiere que el técnico encargado trabaje con la gran cantidad de moscas del programa que terminarán en las trampas.

#### **Origen y manejo de las moscas**

Las moscas estériles deben recibir el mismo tratamiento que las de liberación en el programa de acción. Esto incluye el régimen alimenticio, las condiciones de mantenimiento y cualquier tratamiento previo a la liberación (GRO, metopreno, etc.). Por esta razón, se recomienda recuperar las moscas de la máquina de liberación (como en la sección 6.4.1 Voladoras absolutas) o usar las moscas que están listas para ser liberadas. Los procedimientos para mantener las moscas antes de la liberación deben ser similares a los del centro de emergencia y liberación.

#### **Equipo**

- Trampas cebadas con atrayentes apropiados para las moscas en la prueba (ver abajo).
- Microscopio de disección.
- Lámpara ultravioleta de onda larga.
- Contenedores para mantener las moscas en la misma manera que en el centro de emergencia y liberación.



- Jaulas de malla, jaulas pequeñas con marco de tubos de PVC como en la Prueba de Supervivencia en Jaulas de Campo (en Pruebas Auxiliares, ver Figura 8.3).
- Equipo para evaluar la emergencia de moscas (2.2).
- Vasos varios, pinzas, u otros suministros como sea necesario.

### **Procedimientos**

Los insectos estériles marcados con colorante se envían al centro de emergencia y liberación y se manejan de acuerdo con el protocolo de liberación estándar. Esto incluye colocar las pupas en los mismos contenedores, alimentar y manipular las moscas como si fueran a ser liberadas en el área objetivo.

#### **a) Liberación:**

Las moscas se liberan semanalmente en un punto central de una serie de trampas. Si es posible, los colores del polvo de las moscas deben rotarse semanalmente, al menos entre dos colores. Esto permite seguir liberando individuos durante más de una semana. Las moscas deben liberarse a la edad normal a la que se liberan en el programa de control. Si se prueban moscas de diferentes tratamientos (e.g., cepas, instalaciones y / o tipos de cría o manejo), todas deben liberarse desde el mismo punto y al mismo tiempo pero con diferentes colores por tratamiento. Debido a que generalmente se capturan bajas proporciones de las moscas, se deben liberar grandes cantidades (aproximadamente 10,000 por tratamiento) para obtener datos significativos. El número de adultos liberados se estima con base en la emergencia de moscas y las pruebas de habilidad de vuelo (ver capítulo 2.2.2) que deben realizarse en paralelo.

#### **b) Trampeo:**

Las trampas utilizadas para esta prueba deben incorporar el mejor atrayente comúnmente disponible para machos de la especie que se está probando. Estos incluyen trimedlure para *C. capitata* y metil eugenol o cuelure para las especies apropiadas de *Bactrocera* spp. (ver información detallada sobre trampas y atrayentes en las Guía de Trampeo de FAO / OIEA). Las trampas que usan paraferomonas como atrayentes incluyen las trampas Jackson, IPMT, McPhail, Tephri o cualquiera de las diferentes trampas tipo cubo que contienen un agente letal como naled o DDVP. Para *Anastrepha* spp., Las trampas McPhail cebadas con 5 gránulos de levadura *Torula* c/u todavía se consideran el estándar. Ambos tipos de atrayentes tienen la desventaja de ser atractivos para las moscas a ciertas edades y / o condiciones de la mosca. Por esta razón, algunos estudios de dispersión han utilizado trampas adhesivas, que son menos eficientes pero imparciales con el tipo de mosca que capturarán. Para los atrayentes fuertes, se debe tener cuidado de evitar atrapar una gran cantidad de moscas que pueda interferir con la supervivencia y dispersión de las moscas estériles. Esto podría mejorarse reduciendo el tiempo que queda la trampa en el campo o reduciendo la cantidad de cebos para machos en la trampa.

Las trampas se cuelgan en los sitios seleccionados los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11 después de cada liberación, y, en cada caso, se retiran después de 24 h. Las moscas que se capturan se devuelven al laboratorio y se examinan para detectar la presencia de colorante.

**c) Diseño en el terreno:**

Establecer un diseño específico para las trampas en el campo no es práctico debido a la variación en las condiciones locales, las diferencias entre especies, etc. Sin embargo, siempre que sea posible, se deben considerar las siguientes pautas:

- Las trampas deben colocarse en una serie de círculos concéntricos. Esto generalmente se considera mejor que un diseño de cuadrícula para medir la dispersión. Se debe tener cuidado de mantener la densidad de las trampas al aumentar la distancia desde el punto de liberación.
- Las trampas deben colocarse dentro del follaje de un árbol hospedero conocido, aproximadamente a 2/3 de la altura máxima del árbol. Se debe prestar especial atención de eliminar las hojas o ramas para mantener libre la entrada (s) de las trampas.
- La distancia entre trampas puede variar según la especie, el tipo de trampa, la topografía local y las plantas hospederas disponibles. Sin embargo, la trama idealmente debería ser al menos tan amplia como la distancia entre sitios de liberación adyacentes (o líneas de vuelo) en el programa operativo.

**d) Jaulas de control:**

Las jaulas con moscas deben mantenerse dentro de la parcela para proporcionar datos de mortalidad y sobrevivencia de referencia. El tamaño de las jaulas puede variar, pero es aconsejable usarlas lo más grandes posible (como las de la Prueba de Sobrevivencia en Jaula de Campo o de Desempeño de Cópula). Es importante que dentro de las jaulas las moscas reciban las mismas condiciones que encontrarían en el campo. Por esta razón, es apropiado incluir plantas en macetas de la misma especie presente en el huerto de liberación. Esto aseguraría que las plantas tengan excrementos de pájaros, rocío y otros elementos de los que se alimentan los machos estériles. Si se utilizan jaulas más pequeñas, éstas pueden contar con un marco con un paño fino que permite la entrada de una rama de uno de los árboles en el huerto que servirá tanto para refugio como para alimentación. En cualquier caso, es importante excluir a los depredadores presentes como las arañas y las hormigas. Se debe minimizar la vegetación que toca las jaulas y se puede aplicar stikem o una sustancia pegajosa similar en los puntos que podrían proporcionar rutas de acceso para hormigas y arañas. Se debe colocar un mínimo de 100 moscas por cada combinación de cepa y sexo en las jaulas (jaulas separadas para cada cepa) en el momento de la liberación y después se verifica la mortalidad cada vez que se revisan las trampas. Las jaulas medianas y grandes tienen la desventaja de que las moscas muertas seguramente serán eliminadas por las hormigas. En este caso, en lugar de moscas muertas, el observador debe contar la cantidad de moscas que están vivas para lo que se recomienda usar un aspirador manual como ayuda, y al contarlas colocar las moscas en un recipiente pequeño; después de contar, las moscas deben volver a la jaula. Como alternativa, se pueden usar varias jaulas y cada una se revisa en un momento dado de acuerdo con el cronograma de tiempo para checar las trampas (como en la prueba propuesta por Gomez-Cendra *et al.* 2007). Si se utilizan jaulas pequeñas, se recomienda configurar 3 jaulas por cepa. Si se desea se pueden mantener jaulas adicionales de moscas bajo condiciones controladas como una verificación adicional.

## Interpretación

### a) *Sobrevivencia:*

Las comparaciones directas de los números de captura entre los diferentes días posteriores a la liberación proporcionan estimaciones de sobrevivencia para estos períodos de tiempo en el campo. Esto se puede hacer visualmente trazando la proporción de machos capturados en cada fecha de captura. Debido a que la captura en un día determinado se puede ver afectada por las condiciones en ese día (i.e., el clima), la repetición es necesaria para lograr estimaciones razonablemente confiables. Se puede obtener una indicación más precisa de la sobrevivencia semanal comparando la captura al día siguiente de una liberación de moscas 1, 3 y 5 días antes. Ambos métodos producirán una ligera subestimación de la sobrevivencia a menos que se utilicen fórmulas matemáticas que compensen a las moscas capturadas en las trampas. Además, el tiempo durante el cual las trampas se dejan en el campo también puede afectar los resultados y, a veces, es aconsejable reducirlo a varias horas en lugar de un día completo. La alta mortalidad en las jaulas de control sería indicio de condiciones inusualmente de baja viabilidad en las moscas liberadas.

*Nota:* Las moscas de algunas cepas se desarrollan lentamente o, por alguna otra razón, tienden a capturarse en cantidades bajas el día después de la liberación. Si esto no se ajusta, puede dar estimaciones infladas de supervivencia para tales cepas. Para cepas nuevas, las pruebas deberían realizarse idealmente para estimar la relación entre la edad y la capacidad de respuesta a los atrayentes. Por ejemplo, las moscas que se mantuvieron durante 2, 4, 7 y 10 días después de la emergencia del adulto podrían marcarse con colores diferentes, liberarse simultáneamente en el campo y revisar las moscas atrapadas exclusivamente al día siguiente.

### b) *Dispersión:*

Si bien se han desarrollado muchos modelos matemáticos para describir el movimiento de los insectos en el campo, el índice más simple para la comparación entre días de trampa, cepas, etc., para estas pruebas, es la distancia media ( $\bar{d}$ ) desde el sitio de liberación a la trampa:

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i C_i}{\sum_{i=1}^n C_i}$$

donde  $C_i$  es el número de moscas capturadas en la trampa  $i$ , y  $x_i$  es la distancia entre la trampa  $i$  y el punto de liberación.

Dado que la disponibilidad de fruta hospedera puede influir en la dispersión, el desarrollo de la prueba durante la temporada sin fructificación proporcionará una mejor estimación de la capacidad de dispersión de las moscas estériles, mientras que su realización durante la temporada de fructificación proporcionará la indicación de una dispersión reducida asociada con presencia de frutos hospederos que podría usarse para ajustar el espacio de liberación.

## 6.4. Prueba de Irritabilidad

### Objetivo

Estimar la capacidad de los insectos estériles para responder a los estímulos externos asociados a la presencia de depredadores (capacidad de evadir depredadores) y / u otros factores detrimentales.

### Razonamiento

La capacidad de las moscas estériles para sobrevivir en el campo se ve afectada tanto por factores abióticos como bióticos. La cría masiva ejerce presiones selectivas que pueden conducir a moscas menos reactivas. En condiciones de hacinamiento, las moscas muy nerviosas o irritables tienen una sobrevivencia reducida. Por el contrario, las moscas menos irritables tienden a tener una mayor sobrevivencia y un mayor éxito reproductivo. En la naturaleza, esta irritabilidad o capacidad de responder a estímulos externos puede estar asociada a la capacidad de evadir a los depredadores.

Las moscas de la fruta están expuestas a altas tasas de depredación en el campo. Esto involucra vertebrados y artrópodos y ocurre en la mayoría de las etapas de desarrollo, incluida la etapa adulta. La feromona del macho se usa como señal de orientación para algunas avispa que llegan a los lekks de la mosca del Mediterráneo y depredan a los machos llamando. La capacidad de respuesta del macho (i.e., su capacidad de responder a movimientos en su entorno inmediato), se correlaciona con su capacidad para evadir la depredación. Tal capacidad de responder a los estímulos asociados con la presencia de depredadores es relevante a la hora de evaluar la calidad del macho estéril.

Las pruebas anteriores fueron concebidas para evaluar la capacidad del macho para responder a estímulos externos. La prueba de sobresalto fue desarrollada originalmente por Schroeder *et al.* (1973) y después modificada por Böller *et al.* (1981) para determinar la capacidad de respuesta a la luz. Esta prueba fue diseñada para realizarse en condiciones de laboratorio donde las moscas se confinan en pequeños contenedores. Posteriormente, Hendrichs *et al.* (2007) desarrollaron un método para medir la evasión a la depredación en condiciones de jaula de campo. La prueba se puede hacer con verdaderos depredadores o con la ayuda de un aspirador que simula la depredación. Más recientemente, Rao *et al.* (2014) diseñaron una prueba de laboratorio con verdaderos depredadores.

La prueba aquí descrita es una adaptación de la de Hendrichs *et al.* (2007), y proporciona una manera simple de determinar la capacidad de las moscas para escapar de un evento de depredación simulado al tratar de capturar moscas liberadas en una jaula de campo con la ayuda de un aspirador manual o mecánico. Se puede aplicar para medir el deterioro de la cepa, para comparar entre diferentes cepas y entre el laboratorio y las moscas silvestres

### Origen y manejo de las moscas

#### a) Moscas silvestres:

Las moscas silvestres se recolectan del campo siguiendo los procedimientos descritos en la sección 6.2 Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo. Antes de la emergencia del adulto, las pupas deben pintarse con polvo fluorescente o los adultos deben recibir alimentos teñidos después de la emergencia y antes de la prueba.

### ***b) Moscas estériles:***

Las pupas estériles deben provenir de una planta de cría masiva cuyos procedimientos deben ser los que normalmente se usan para los machos liberados. Solo en evaluaciones particulares se deben usar pupas provenientes de otras instancias, tales como de la colonia del filtro. Los procedimientos de manejo deben seguir los explicados en la sección 6.2 Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo. Las pupas deben pintarse con polvo fluorescente o los adultos deben recibir alimentos teñidos con un color diferente al de las moscas silvestres. Las moscas pueden venir directamente del centro de liberación en el momento en que se liberan en el campo.

### ***c) Moscas fértiles de cría masiva:***

Si se considera que la irradiación podría estar afectando la capacidad de reacción, entonces sería deseable comparar moscas de laboratorio estériles vs fértiles. En este caso, las pupas deben provenir del mismo lote sometido a irradiación. Los procedimientos de manejo deben ser iguales a los de las moscas estériles.

## **Equipo**

- Todo el equipo necesario para mantener las moscas en el laboratorio desde su emergencia hasta su liberación en la jaula de campo (ver detalles del material en la sección 6.2 Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo).
- Todo el equipo necesario para marcar las moscas (ver detalles del material en la sección 6.2 Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo).
- Jaula de campo al aire libre, 2 m de altura por 2.9 m de diámetro, instalada sobre una planta que cubre una porción grande del volumen de la jaula.
- Aspirador mecánico con batería (bomba de succión) adaptado con un tubo de vidrio en el extremo del aspirador para recoger las moscas. La punta del tubo de vidrio, desde donde se aspiran las moscas, debe tener una abertura de 5 a 10 mm de diámetro doblada en un ángulo de 70-75 grados para facilitar el acceso a las moscas. Con este aspirador mecánico, se garantiza que los eventos de depredación simulados se realicen de manera uniforme donde sea que se realice la prueba.
- Contenedor de plástico para liberar las moscas capturadas.
- Microscopio de disección con luz fluorescente o lámpara ultravioleta de onda larga para identificar si las moscas están marcadas con el polvo fluorescente.

## **Procedimientos**

Hay que mantener las moscas en las mismas condiciones y régimen dietético hasta su liberación en la jaula de campo después de alcanzar la madurez sexual. El día de la prueba, se liberan 150 moscas de cada origen y / o sexo para evaluar en la jaula. Se deben proporcionar 15 minutos para la aclimatación de las moscas. Se capturan 20 moscas con la ayuda del aspirador a intervalos de 1 a 2 minutos por captura, evitando eliminar las moscas que se encuentran en la malla de la jaula dado que tienen más posibilidades de detectar la aproximación del observador. Al salir de la jaula se identifican el origen de las moscas capturadas bajo la luz ultravioleta (idealmente, el observador no debe conocer el origen de las moscas en el momento de la captura). Se repite el procedimiento al menos en tres momentos diferentes del día para cubrir todas las horas de actividad de las moscas. Se realizan un total de 10-15 réplicas en 5-10 días con al menos 6-10 lotes diferentes de moscas estériles. Si la

probabilidad de captura se asocia con una actividad particular (momento del llamado, descanso, alimentación, etc.), se debe asignar un cuidado especial para buscar moscas involucradas en esta actividad particular en cada conjunto de intentos de captura. Si se usan verdaderos depredadores en lugar del aspirador, la prueba debe realizarse de la siguiente manera: después de la liberación de la mosca, se da un cierto tiempo para permitir que las moscas se adapten. Luego se suelta el número deseado de depredadores y se dejan en la jaula durante un cierto período de tiempo. Después de este tiempo, el observador entra en la jaula y elimina todas las moscas vivas. Las moscas se llevan al laboratorio y se identifican bajo la luz ultravioleta. Se estima la proporción de moscas capturadas de cada origen y se realizan análisis estadísticos de frecuencia, como una prueba de proporción o un  $\chi^2$  de Bondad de ajuste.

### **Interpretación**

La proporción de moscas capturadas durante un muestreo "ciego" es un buen reflejo de la capacidad de las moscas estériles para evadir la depredación en relación con las moscas silvestres. Sin embargo, esta aproximación requiere que se liberen al menos dos conjuntos diferentes de moscas en la misma jaula. En los casos en que no se busca una medida relativa, entonces la prueba debe modificarse para registrar el tiempo requerido para recolectar cada tipo de mosca (i.e., cuán fácil o difícil fue su captura).

## **6.5. Literatura Relevante**

**Allinghi, A., G. Calcagno, N. Petit-Marty, P. Gómez Cendra, D. Segura, T. Vera, J. Cladera, C. Gramajo, E. Willink and J.C. Vilardi. 2007.** Compatibility and Competitiveness of a Laboratory Strain of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) after Irradiation Treatment. Fla. Entomol. 90(1): 27-32.

**Aluja, M., I. Jacome, A. Birke, N. Lozada and G. Quintero. 1993.** Basic patterns of behavior in wild *Anastrepha striata* (Diptera: Tephritidae) flies under field cage conditions. Ann. Entomol. Soc. Am. 86(6): 776-793.

**Baker, P.S. and A.S.T. Chan. 1991.** Identification of tephritid fruit fly dispersal. Guidelines for a sterile release programme. J. Appl. Entomol. 112: 410-421.

**Baker, P.S., A.S.T. Chan and M.A. Jimeno-Zavala. 1986.** Dispersal and orientation of sterile *Ceratitidis capitata* and *Anastrepha ludens* (Tephritidae) in Chiapas. J. Appl. Ecol. 23: 27-38.

**Bateman, A. J. 1949.** Analysis of data on sexual isolation. Evolution. 3: 174-177.

**Bloem, K., S. Bloem, D. Chambers and E. Muñiz. 1993.** Field evaluation of quality: release-recapture of sterile medflies of different sizes. 295-296 In Aluja, M., and P. Liedo [eds.] Fruit flies: biology and management. Springer-Verlag, New York, NY, USA.

**Boller, E.F., U. Remund, B.I. Katsoyannos and W. Berchtold. 1977.** Quality control in European cherry fruit fly: evaluation of mating activity in laboratory and field cage tests. Z. Angew. Ent. 83: 183-201.

**Boller, E.F., B.I. Katsoyannos, U. Remunf and D.L. Chambers. 1981.** Measuring, monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Wied.) 1. The RAPID quality control system for early warning. J. Appl. Entomol. 92: 67-83.

**Bonizzoni, M., L.M. Gomulski, S. Bertin, F. Scolari, C.R. Guglielmino, B. Yuval, G. Gasperi and A.R. Malacrida. 2007.** Unfaithful Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* females: impact on

the SIT?. 175-182. In Vreysen, M. J. B., A. S. Robinson and J. Hendrichs. Area-wide control of insect pests. From research to field implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

**Briceño, R.D. and W.G. Eberhard. 1998.** Medfly courtship duration: a sexually selected reaction norm changed by crowding. *Ethology Ecology & Evolution*. 10: 369-382.

**Briceño, D., W. Eberhard and T. Shelly. 2007.** Male Courtship Behavior in *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) that Have Received Aromatherapy with Ginger Root Oil. *Fla. Entomol.* 90(1): 175-179.

**Briceño, R.D., W.G. Eberhard, J.C. Vilardi, P. Liedo and T.E. Shelly. 2002.** Variation in the intermittent buzzing songs of male medflies (Diptera: Tephritidae) associated with geography, mass-rearing, and courtship success. *Fla. Entomol.* 85(1): 32-40.

**Briceño, R.D., D. Ramos and W.G. Eberhard. 1996.** Courtship behavior of male medflies *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) in captivity. *Fla. Entomol.* 79(2): 130-143.

**Burk, T. and J.C. Webb. 1983.** Effect of male size on calling propensity, song parameters, and mating success in Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 678

**Cáceres, C., D.O. McInnis, T. Shelly, E. Jang, A. Robinson and J. Hendrichs. 2007.** Quality management systems for fruit fly (Diptera: Tephritidae) sterile insect technique. *Fla. Entomol.* 90(1). 1-9.

**Calcagno, G.E., F. Manso and J.C. Vilardi. 2002.** Comparison of mating performance of medfly (Diptera, Tephritidae) genetic sexing and wild type strains: field cage and video recording experiments. *Fla. Entomol.* 85(1): 41-50.

**Calkins, C.O. and J.C. Webb. 1983.** A cage and support framework for behavioral tests of fruit flies in the field. *Fla. Entomol.* 66(4): 512-514.

**Calkins, C.O. and A.G. Parker. 2005.** Sterile Insect Quality. 269-296. In Dyck, V. A., J. Hendrichs and A. S. Robinson. [eds.], *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

**Cayol, J.P. 2000.** Changes in sexual behavior and in some life history traits of Tephritid species caused by mass-rearing processes. 843-860. In Aluja, M. and A. Norrbom [eds.], *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press. Boca Raton, Florida.

**Cayol, J.P., J. Vilardi, E. Rial and M.T. Vera. 1999.** New indices and method to measure the sexual compatibility and mating performance of medfly (Diptera, Tephritidae) laboratory reared strains under field cage conditions. *J. Econ. Entomol.* 92(1): 140-145.

**Cayol, J.P., P. De Coronado and M. Taher. 2002.** Sexual compatibility in medfly (Diptera: Tephritidae) from different origins. *Fla. Entomol.* 85(1): 51-57.

**Chambers, D.L., C.O. Calkins, E.F. Boller, Y. Itô and R.T. Cunningham. 1983.** Measuring, monitoring and improving the quality of mass-reared Mediterranean fruit flies, *Ceratitidis capitata* (Wied). 2. Field tests for confirming and extending laboratory results. *J. Appl. Ent.* 95: 285-303.

**Collins, S.R., C.W. Wldon and P.W. Taylor. 2009.** Effects of filed cage colour and supplementary shade on environmental conditions and mating behavior of Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*. *Entomol. Exp. Appl.* 129: 142-147.

**De Meyer, M., A.R. Clarke, M.T. Vera and J. Hendrichs (eds.). 2015.** Resolution of Cryptic Species Complexes of Tephritid Pests to Enhance SIT Application and Facilitate International Trade. *ZooKeys* 540.

**Dunham, M. 1994.** An easily-constructed temporary cage for studying animals in the field. *Fla. Entomol.* 77(4): 505-508.

- Faria, M.J., R. Pereira, T. Dellinger and P.E.A. Teal. 2010.** Influence of methoprene and protein on survival, maturation and sexual performance of male *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.* 132: 812–819.
- Froerer, K.M., S.L. Peck, G.T. McQuate, R.I. Vargas, E.B. Jang, and D.O. McInnis. 2010.** Long-distance movement of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Puna, Hawaii: How far can they go?. *Am. Entomol.* 56: 88-94.
- Gavriel, S., Y. Gazit, A. Leach, J. Mumford and B. Yuval. 2012.** Spatial patterns of sterile Mediterranean fruit fly dispersal. *Entomol. Exp. Appl.* 142: 17-26.
- Gilchrist, A.S. and A.W. Meats. 2012.** Factors affecting the dispersal of large-scale releases of the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*. *J. Appl. Entomol.* 136: 252–262.
- Gómez Cendra, P., D. Segura, A. Allinghi, J. Cladera and J. Vilardi. 2007.** Comparison of Longevity between a Laboratory Strain and a Natural Population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) under Field Cage Conditions. *Fla. Entomol.* 90(1): 147-153.
- Haq, I.U., C. Cáceres, P.E.A. Teal, V. Wornoayporn, C. Stauffer and J. Hendrichs. 2010.** Effects of the juvenile hormone analogue methoprene and dietary protein on male melon fly *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) mating success. *J. Insect Physiol.* 56: 1503-1509.
- Hendrichs, J. 1986.** Sexual selection in wild and sterile Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa*. M.Sc.Thesis. Univ. of Florida, Gainesville, Fla. 263 pp.
- Hendrichs, J., B. Katsoyannos, V. Wornoayporn, and M.A. Hendrichs. 1994.** Odour-mediated foraging by yellowjacket wasps (Hymenoptera: Vespidae): predation on leks of pheromone-calling Mediterranean fruit fly males (Diptera: Tephritidae). *Oecologia* 99:88–94.
- Hendrichs, J., V. Wornoayporn, B. I. Katsoyannos and K. Gaggl. 1993.** First field assessment of the dispersal and survival of mass reared sterile Mediterranean fruit fly males of an embryonal temperature sensitive genetic sexing strain. 453-462. In IAEA [ed.], Management of insect pests: nuclear and related molecular and genetic techniques. IAEA. Vienna, Austria.
- Hendrichs, M.A. and J. Hendrichs. 1998.** Perfumed to be killed: interception of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) sexual signaling by predatory foraging wasps (Hymenoptera: Vespidae). *Ann. Entomol. Soc. Am* 91:228–234.
- Hendrichs, M.A., V. Wornoayporn, B. Katsoyannos and J. Hendrichs. 2007.** Quality control Method to measure predator evasion in wild and mass-reared Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 90(1): 64-70.
- Hernandez, E., D. Orozco, M. Hernandez, J.S. Meza, S. Flores and J. Dominguez. 2003.** Quality assurance of mass produced and released fruit flies: third progress report. RC 10839/R2. IAEA. Vienna, Austria.
- Hernández, E., D. Orozco, S. Flores Breceda and J. Domínguez. 2007.** Dispersal and Longevity of Wild and Mass-reared *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 90(1): 123-135.
- Hibino, Y. and O. Iwahashi. 1989.** Mating receptivity of wild type females for wild type males and mass-reared males in the Melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). *Appl. Ent. Zool.* 24(1): 152-154.
- Hibino, Y. and O. Iwahashi. 1991.** Appearance of wild females unreceptive to sterilized males on Okinawa Island in the eradication program of the Melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). *Appl. Ent. Zool.* 26(2): 265-270.
- (IAEA) International Atomic Energy Agency. 2003.** Trapping guidelines for area-wide fruit fly programmes. Joint FAO/IAEA Division. Vienna, Austria. 47pp.



- Iwahashi, O., Y. Ito and M. Shiyomi. 1983.** A field evaluation of the sexual competitiveness of sterile melon flies, *Dacus (Zeugodacus) cucurbitae*. Ecol. Entomol. 8: 43-48.
- Jackson, C.G. and J.P. Long. 1997.** Mating behavior of *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) in field cages. Ann. Entomol. Soc. Am. 90(6): 856-860.
- Jang, E.B., D.O. McInnis, D.R. Lance and L.A. Carvalho. 1998.** Mating-induced changes in olfactory-mediated behavior of laboratory-reared normal, sterile, and wild female Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) mated to conspecific males. Ann. Entomol. Soc. Am. 91(1): 139-144.
- Jordão Paranhos, B., N.T. Papadopoulos, D. McInnis, C. Gava, F.S.C. Lopes, R. Morelli and A. Malavasi. 2010.** Field dispersal and survival of sterile medfly males aromatically treated with ginger root oil. Environ. Entomol. 39(2): 570-575.
- Katsoyannos, B.I., N.T. Papadopoulos, J. Hendrichs and V. Wornoayporn. 1989.** Comparative response to citrus foliage and citrus fruit odour by wild and mass-reared sterile Mediterranean fruit fly males of a genetic sexing strain. J. Appl. Ent. 123: 139-143.
- Kouloussis, N.A., B.I. Katsoyannos, N.T. Papadopoulos, C.S. Ioannou and I.V. Iliadis. 2010.** Enhanced mating competitiveness of *Ceratitis capitata* males following exposure to citrus compounds. J. Appl. Entomol. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2010.01535.x.
- Koyama, J., H. Nakamori and H. Kuba. 1986.** Mating behavior of wild and mass-reared strains of the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae), in a field cage. Appl. Ent. Zool. 21(2): 203-209.
- Kuba, H. and J. Koyama. 1985.** Mating behavior of wild melon flies, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae) in a field cage: courtship behavior. Appl. Ent. Zool. 20(4): 365-372.
- Lance, D.R., D.O. McInnis, P. Rendon and C.G. Jackson. 2000.** Courtship among sterile and wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in field cages in Hawaii and Guatemala. Ann. Entomol. Soc. Am. 93(5): 1179-1185.
- Liedo, P., G. Ibarra, A.B. Davila, M.I. Barrios, M.L. Sosa and G. Perez-Lachaud. 1996.** Mating competitiveness of three mass-reared strains of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). In IAEA [ed.], Second RCM on "Medfly mating behaviour under field cage conditions", Tapachula, Mexico, 19-23 February 1996. IAEA. Vienna, Austria.
- Liedo, P., E. De Leon, M.I. Barrios, J.F. Valle-Mora and G. Ibarra. 2002.** Effect of age on the mating propensity of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 85(1): 94-101.
- Liedo, P., D. Orozco, L. Cruz-López, J.L. Quintero, C. Becerra-Pérez, M. Del Refugio Hernández, A. Oropeza and J. Toledo. 2010.** Effect of post-teneral diets on the performance of sterile *Anastrepha ludens* and *Anastrepha obliqua* fruit flies. J. Appl. Entomol.
- Liedo, P., S. Salgado, A. Oropeza and J. Toledo. 2007.** Improving Mating Performance of Mass-reared Sterile Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) through Changes in Adult Holding Conditions: Demography and Mating Competitiveness. Fla. Entomol. 90(1): 33-40.
- Lux, S.A., F.N. Munyiri, J.C. Vilardi, P. Liedo, A. Economopoulos, O. Hasson, S. Quilici, K. Gaggli, J.P. Cayol and P. Rendon. 2002.** Consistency in courtship pattern among populations of medfly (Diptera: Tephritidae): comparisons among wild strains and strains mass reared for SIT operations. Fla. Entomol. 85(1): 113-125.
- Maor, M., B. Kamensky, S. Shlsoush and B. Yuval. 2004.** Effects of post-teneral diet on foraging success of sterile male Mediterranean fruit flies. Entomol. Exp. et App. 110: 225-230.
- McInnis, D.O., D.R. Lance and C.G. Jackson. 1996.** Behavioral resistance to the Sterile Insect Technique by Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. Ann. Entomol. Soc. Am. 89(5): 739-744.

- McInnis, D.O., B.J. Paranhos and T.E. Shelly. 2013.** Survival of sterile male Mediterranean fruit flies in large field cages after release at different ages. *J. Appl. Entomol.* 137 (Supplement 1): S43-S48.
- McInnis, D.O., P. Rendon, E.B. Jang, A. Van Sauers-Muller, R.L. Sugayama and A. Malavasi. 1999.** Interspecific mating of introduced, sterile *Bactrocera dorsalis* with wild *B. carambolae* (Diptera: Tephritidae) in Suriname: a case for cross-species sterile insect technique. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 758-765.
- McInnis, D.O., P. Rendon and J. Komatsu. 2002.** Mating and remating of medflies (Diptera: Tephritidae) in Guatemala: individual fly marking in field cages. *Fla. Entomol.* 85(1): 126-137.
- Meats, A. 2007.** Dispersion of Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) at High and Low Densities and Consequences of Mismatching Dispersions of Wild and Sterile Flies. *Fla. Entomol.* 90(1): 136-146.
- Meats, A., C.J. Smallridge and B.C. Dominiak. 2006.** Dispersion theory and the sterile insect technique: application to two species of fruit fly. *Entomol. Exp. Appl.* 119: 247-254.
- Meats, A. and C. J. Smallridge. 2007.** Short- and long-range dispersal of medfly, *Ceratitidis capitata* (Dipt., Tephritidae), and its invasive potential. *J. Appl. Entomol.* 131(8): 518-523.
- Morelli, R., B.J. Paranhos, A.M. Coelho, R. Castro, L. Garziera, F. Lopes and J.M.S. Bento. 2010.** Exposure of sterile Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) males to ginger root oil reduces female remating. *J. Appl. Entomol.* DOI: 10.1111/j.1439-0418.2010.01584.x.
- Orozco, D. and R.O. Lopez. 1993.** Mating competitiveness of wild and laboratory mass-reared medflies: effect of male size. 185-188. In Aluja, M., and P. Liedo, [eds.], *Fruit flies: biology and management*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Orozco-Dávila, D., R. Hernández, S. Meza and J. Domínguez. 2007.** Sexual competitiveness and compatibility between mass-reared sterile flies and WILD populations of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) from different regions in Mexico. *Fla. Entomol.* 90(1): 19-26.
- Paranhos, B.J., D. McInnis, R. Morelli, R.M. Castro, L. Garziera, L.G. Paranhos, K. Costa, C. Gava, M. L.Z. Costa and J.M.M. Walder. 2010.** Optimum dose of ginger root oil to treat sterile Mediterranean fruit fly males (Diptera: Tephritidae). *J. Appl. Entomol.* DOI: 10.1111/j.1439-0418.2010.01595.x.
- Pereira, R., N. Silva, C. Quintal, R. Abreu, J. Andrade and L. Dantas. 2007.** Sexual performance of mass reared and wild Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from various origins of the Madeira islands. *Fla. Entomol.* 90(1): 10-14.
- Pereira, R., N. Silva, C. Quintal, R. Abreu, J. Andrade and L. Dantas. 2007.** Effect of acclimation to outdoor conditions on the sexual performance of mass-produced medflies (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 90(1): 171-174.
- Pereira, R., J. Sivinski and P. E. A. Teal. 2009.** Influence of methoprene and dietary protein on male *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) mating aggregations. *J. Insect Physiol.* 55: 328-335.
- Plant, R.E. and R.T. Cunningham. 1991.** Analyses of the dispersal of sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) released from a point source. *Environ. Entomol.* 20: 1493-1503.
- Prokopy, R.J. and J. Hendrichs. 1979.** Mating behavior of *Ceratitidis capitata* on a field-caged host tree. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 642-648.
- Rao D., S. Aguilar-Argüello, P. Montoya and F. Díaz-Fleischer. 2014.** The effect of irradiation and mass rearing on the anti-predator behaviour of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research* 104: 176-181.

- Rendon, P., D.O. McInnis, D.R. Lance and J. Stewart. 2000.** Comparison of medfly male-only and bisexual releases in large scale field trials. 517-525. In Tan, K. H. [ed.], Area-wide management of fruit flies and other major insect pests. Penerbit Universiti Sains Malaysia. Penang, Malaysia.
- Robinson, A.S., U. Cirio, G.H.S. Hooper and M. Capparella. 1986.** Field cage studies with a genetic sexing strain in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. Entomol. Exp. Appl. 41: 231-235.
- Schroeder, W.J. and D.L. Chambers. 1977.** Measuring the startle activity in Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, populations. pp. 35-36 In E. F. Boller and D. L. Chambers [eds.], Quality Control, An Idea Book for Fruit Fly Workers. Bulletin 1977/5, WPRS-IOBC.
- Schroeder, W.J., D.L. Chambers, and R.Y. Miyabara. 1973.** Mediterranean fruit fly: propensity to flight of sterilized flies. J. Econ. Entomol 66:1261–1262.
- Segura, D., N. Petit-Marty, R. Sciurano, T. Vera, G. Calcagno, A. Allinghi, P. Gómez Cendra, J. Cladera and J. Vilardi. 2007.** Lekking Behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 90(1): 154-162.
- Shelly, T.E., J. Edu and J. Nishimoto. 2010.** Chilling and flight ability and mating competitiveness of sterile males of the Mediterranean fruit fly. J. Appl. Entomol. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2010.01532.x.
- Shelly, T.E., S.S. Kennelly and D.O. McInnis. 2002.** Effect of adult diet on signaling activity, mate attraction, and mating success in male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 85(1): 150-155.
- Sivinski, J., C.O. Calkins and R. Baranowski. 1994.** A container for eclosion and holding adult insects prior to release. Fla. Entomol. 77(4): 513-515.
- Sookar, P., I. Haq, A. Jessup, D. McInnis, G. Franz, V. Wornoyaporn and S. Permalloo. 2010.** Mating compatibility among *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) populations from three different origins. J. Appl. Entomol. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2010.01576.x.
- Stalker, H.D. 1942.** Sexual isolation studies in the species complex *Drosophila virilis*. Genetics. 27: 238-267.
- Teal P.E.A., Y. Gomez-Simuta, B.D. Dueben, T.C. Holler and S. Olson. 2007.** Improving the efficacy of the sterile insect technique for fruit flies by incorporation of hormone and dietary supplements into adult holding protocols. 163-174. In Vreysen, M. J. B., A. S. Robinson and J. Hendrichs. Area-wide control of insect pests. From research to field implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Thomas, D.B. and J. Loera-Gallardo. 1998.** Dispersal and longevity of mass-released, sterilized Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). Environ. Entomol. 27(4): 1045-1052.
- Vera, M.T., R.J. Wood, J.L. Cladera and A.S. Gilburn. 2002.** Factors affecting female remating frequency in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 85(1): 156-164.
- Vreysen, M.J.B. 2005.** Monitoring sterile and wild insects in area-wide integrated pest management programmes. 325-362. In Dyck, V. A., J. Hendrichs and A. S. Robinson. [eds.], Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Vreysen, M.J.B., K.M. Saleh, R. Lancelot and J. Bouyer. 2011.** Factory tsetse flies must behave like wild flies: a prerequisite for the sterile insect technique. PLoS Negl Trop Dis 5(2): e907. doi:10.1371/journal.pntd.0000907

- Weldon, C. and A. Meats. 2007.** Short-range dispersal of recently emerged males and females of *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera:Tephritidae) monitored by sticky sphere traps baited with protein and Lynfield traps baited with cue-lure. *Aust. J. Entomol.* 46: 160–166.
- Wong, T.T.Y., J.I. Nishimoto and H. Melvin Couey. 1983.** Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): further studies on selective mating response of wild and of unirradiated and irradiated, laboratory-reared flies in field cages. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76(1): 51-55.
- Yamamura, K., M. Kishita, N. Arakaki, F. Kawamura and Y. Sadoyama. 2003.** Estimation of dispersal distance by mark-recapture experiments using traps: correction of bias caused by the artificial removal by traps. *Popul. Ecol.* 45:149–155. DOI 10.1007/s10144-003-0152-x.
- Yuval, B., M. Maor, K. Levy, R. Kaspi, P. Taylor and T. Shelly. 2007.** Breakfast of Champions or Kiss of Death? Survival and Sexual Performance of Protein-fed, Sterile Mediterranean Fruit Flies (Diptera: Tephritidae). *Fla. Entomol.* 90(1): 115-122.
- Zapien, G.I., J. Hendrichs, P. Liedo and A. Cisneros. 1983.** Comparative mating behaviour of wild and mass-reared sterile medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) on a field cage host tree - II. Female mate choice. 397-409. In Cavalloro, R. [ed.], *Fruit flies of economic importance*. A.A. Balkema. Rotterdam, the Netherlands.

## 7. Pruebas Auxiliares

### 7.1. Prueba de Actividad

#### Objetivo

Evaluar el nivel de actividad de los machos estériles en comparación con las moscas silvestres

#### Discusión

Como se indicó en la Prueba de irritabilidad (sección 6.4), las moscas de cría masiva a menudo exhiben un patrón de actividad disminuido, vuelan menos y responden más lentamente a los estímulos adversos, lo que resulta en una mayor vulnerabilidad a los depredadores. Esta reducción en la actividad puede cuantificarse en condiciones de laboratorio con la ayuda de grabaciones de video. Los procedimientos presentados aquí son los reportados por Weldon *et al.* (2010), donde se comparó el patrón de actividad de la mosca de la fruta de Queensland, *B. tryoni*, de una colonia de cría masiva comparada con las moscas silvestres.

#### Origen y manejo de las moscas

**Moscas silvestres y machos estériles de laboratorio:** Igual que para la prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo, sin embargo, en este caso, las moscas pueden ser evaluadas antes y/o después de alcanzar la madurez sexual.

#### Equipo

- Todo el equipo necesario para obtener las moscas adultas.
- Jaulas de grabación: jaulas transparentes de Plexiglas de aproximadamente 1-2 L para contener moscas.
- Videocámara digital.
- Computadora con software específico para analizar grabaciones (e.g., JWatcher, Etholog).
- Luz artificial.

#### Procedimientos

Los procedimientos pueden variar entre las pruebas que involucran moscas inmaduras o maduras y / o después de tratamientos de un solo sexo o de ambos sexos. La última opción puede usarse para determinar si las diferencias en la actividad resultan de la presencia de individuos del sexo opuesto. Cuando las moscas estén en la edad adecuada, se colocan 3-5 moscas de un sexo (en el caso de que solo se libere un sexo) y 3-4 moscas de un sexo y un individuo del sexo opuesto en las jaulas de grabación se esperan de cinco a diez minutos para la aclimatación y después se registra la actividad de las moscas durante aproximadamente diez minutos, asegurándose de que todas las moscas estén visibles durante todo el período de grabación. Se realizan grabaciones para varios grupos (al menos 5) al amanecer, el mediodía, la tarde y el anochecer.

#### Interpretación

Las grabaciones se deben observar en tiempo real y elegir un individuo focal dentro del grupo para estimar el tiempo dedicado a cada una de las siguientes actividades: volar, arreglarse, caminar, interactuar con otros (pelear, cortejar) o estar inactivo; el comportamiento se analiza mediante análisis multivariado de varianza (MANOVA). Las diferencias en los patrones de

actividad entre moscas silvestres y las criadas en masa pueden indicar que el entorno de cría masiva está seleccionando moscas menos activas porque las moscas altamente activas son más propensas a sufrir daños físicos (colisiones) que las moscas menos activas, o gastan mucha energía en las peleas o interacciones agonistas que reducen su sobrevivencia. Además, en cría masiva no es necesario moverse largas distancias durante la búsqueda de alimentos. Se deben identificar formas de reducir esta fuerza de selección para retrasar la necesidad de reemplazar las cepas. Existe evidencia de que esto se puede lograr en la mosca del Mediterráneo al proporcionarles a las moscas una superficie adicional dentro de la jaula para posarse y mostrar el cortejo.

## 7.2. Observaciones Detalladas de Comportamiento de Cortejo y Lek

### Objetivo

Complementar las observaciones sobre el comportamiento sexual del macho y la respuesta de la hembra para detectar diferencias entre moscas silvestres y estériles. En particular, tiene como objetivo observar en detalle el momento, la ubicación y la agregación en el "llamado" y las interacciones entre machos y hembras.

### Discusión

Los machos de las especies "lekking" exhiben un cortejo elaborado que implica la emisión de diferentes señales que son escrutadas por las hembras para elegir a sus parejas. Es posible obtener información más detallada durante las Pruebas de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo (6.2) liberando un número menor de moscas, preferiblemente etiquetadas individualmente, y observando su comportamiento durante todo el período de la prueba. Los procedimientos utilizados para hacer estas observaciones son flexibles y dependerán de las características particulares de la especie en cuestión. Aquí proporcionamos alguna orientación.

### Origen y manejo de las moscas

**Moscas silvestres y machos de laboratorio estériles:** Como en la Prueba de Desempeño de cópula en Jaula de Campo (6.2). Sin embargo, en este caso, se recomienda etiquetar cada mosca para identificar y registrar su comportamiento. Esto se puede lograr usando diferentes colores (si se liberan pocas moscas en la jaula) o pegando una letra pequeña (tamaño de fuente # 3) en el tórax (**Figura 7.1**). Las hembras también pueden ser marcadas dependiendo del objetivo particular de esta prueba.



**Figura 7.1** Pareja de *Ceratitis capitata* donde la hembra está marcada con una pequeña letra y el macho está pintado en el tórax.

## Equipo

- Todo el equipo requerido para la Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo (6.2), incluyendo las jaula de campo estándar al aire libre con árboles hospederos.
- Material para marcar las moscas individualmente: pintura basada en agua de diferentes colores permitirá la liberación de más de 50 moscas maracas individualmente dentro de una jaula.

## Procedimientos

Para determinar el alcance y el momento de la participación de los machos en los comportamientos previos al apareamiento, se puede realizar un censo a intervalos regulares (e.g., cada 10-15 minutos o media hora). Durante el censo, se registra el número, la ubicación y la identificación de cada macho "llamando" (i.e., liberando feromona) dentro de la jaula o que está involucrado en el cortejo con una hembra. Los machos que llaman están típicamente (pero no siempre) en el envés de las hojas. En la mosca del Mediterráneo (**Figura 7.2**) y en algunas especies de *Anastrepha*, se pueden identificar por la presencia de lo que parece ser una gota de líquido en la punta del abdomen (en realidad, un saco se extiende desde el ano) y por bolsas infladas en la pleura. Los machos llamando puede vibrar intermitentemente o "abanicar" sus alas mientras están posados en su lugar; durante el abaniqueo de las alas, en algunos casos el saco anal se retrae parcialmente y se mantiene debajo del abdomen, por lo que es más difícil de observar.



**Figura 7.2** Macho de *Ceratitits capitata* llamando, puede ser identificado por la presencia de lo que parece una gota de líquido en la punta del abdomen (en realidad, un saco es extendido desde el ano) así como por las bolsas infladas en la pleura.

Para cada macho individual, el observador puede evaluar la cantidad de intentos de apareamiento que son rechazados por las hembras y la cantidad de veces que se involucran en interacciones agonistas con otros machos. Las parejas en cópula pueden dejarse dentro de la jaula de campo dado que la identificación individual permite grabar el apareamiento durante

la prueba sin la necesidad de tenerlas confinadas en un vial pequeño. El período de observación termina una vez que finaliza el período de actividad sexual de la especie.

### **Interpretación**

El Llamado, o liberación de feromonas para atraer hembras, es un paso temprano y crítico en el esfuerzo de un macho para asegurar una cópula. En una situación de jaula de campo, el número de machos estériles que se observan llamando normalmente sería tan alto o incluso mayor que el número de machos silvestres llamando.

La incidencia de las llamadas es un componente de la propensión a la cópula, y una baja incidencia de llamadas de machos estériles podría ser indicio de baja calidad del macho. Los machos estériles también podrían exhibir un bajo nivel de participación en las cópulas a pesar de una incidencia relativamente alta de llamadas. Ese escenario podría ocurrir si (1) los machos estériles no fueran efectivos para atraer a hembras no apareadas a su vecindad inmediata (tal vez por cambios en la composición de feromonas resultantes de la cría masiva) y / o (2) hembras que fueron atraídas a machos estériles pero que raramente copulan con ellos.

La periodicidad de las llamadas se puede evaluar comparando la proporción de machos estériles y silvestres que están llamando en diferentes momentos del día. Si se descubre que los machos estériles están llamando activamente pero son rechazados por las hembras que se acercan, entonces es conveniente seguir esta observación con la "Prueba de compatibilidad de feromonas", descrita en la sección 7.5.

En adición, los datos también se pueden usar para verificar la periodicidad diaria del comportamiento sexual de machos estériles en comparación con machos silvestres, y para determinar si los machos estériles y silvestres llaman desde los mismos lugares. Además, estudios de observación detallados permiten estimar la tasa a la que las hembras aceptan machos estériles o silvestres al cuantificar el número de visitas de hembras a los diferentes tipos de machos llamando y cortejando, y registrar el rechazo o la aceptación de los machos por las hembras. Esta información es relevante si se detectan valores de incompatibilidad extrema o competitividad reducida y puede llevar a decisiones para modificar las condiciones de cría o de reemplazar la cepa para restaurar la competitividad.

## **7.3. Prueba de Llamado de Feromonas**

### **Objetivo**

Determinar si la feromona producida por los machos de cría masiva que fueron esterilizados y liberados es atractiva para las hembras silvestres.

### **Discusión**

Con frecuencia, las colonias de moscas de la fruta permanecen en las plantas de cría durante muchas generaciones sin la entrada de nuevos genes. El apareamiento se produce en condiciones extremadamente concurridas, y prevalecen dudas sobre el papel de la feromona en el cortejo. Bajo la cría masiva, existe la posibilidad de que la producción de feromonas se altere (refs - Phil para encontrar). También existe la posibilidad de que la proporción de los componentes de la feromona pueda cambiar (refs - Heath). Si se produce alguna de estas situaciones se podría afectar la reacción de las hembras silvestres a los machos estériles en la



arena de apareamiento. A continuación se describe una prueba simple que se puede incluir mientras se realiza la Prueba de desempeño de cópula en jaula de campo (Sección 6.2).

### **Origen y manejo de las moscas**

#### ***Moscas silvestres y machos estériles:***

Igual que en la prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo (sección 6.2), pero en este caso es extremadamente importante que las moscas silvestres maduren en una habitación distinta a las moscas estériles para evitar cualquier contacto de volátiles entre moscas de diferentes orígenes. Las hembras silvestres deben mantenerse en una habitación separada.

### **Equipo**

- Todo el equipo requerido para la Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo (6.2), incluyendo las jaula de campo estándar al aire libre con árboles hospederos.
- Nueve jaulas de malla pequeñas (e.g., 10 x 5 x 5 cm) con un cordón con ganchos en los extremos para suspender las jaulas dentro de la jaula de campo estándar.

### **Procedimientos**

Se colocan 5 machos estériles por jaula en 3 jaulas pequeñas, y 5 machos silvestres por jaula en 3 jaulas pequeñas, las cuales se suspenden de manera equidistante de las ramas a la sombra de los árboles. La colocación de las jaulas que contienen machos estériles y silvestres debe ser alterna. Se liberan 100 hembras vírgenes silvestres sexualmente maduras dentro de la jaula de campo, después de 10 minutos se registra el número de moscas hembras sobre o dentro de un perímetro de 10 cm de cada jaula y el número de machos llamando en cada jaula. Después, de manera suave se sopla sobre las hembras posadas en las jaulas para alejarlas. Se repite la evaluación cada 10 minutos durante al menos 4 períodos durante el tiempo pico de llamados para cada jaula pequeña en cada posición dentro de la jaula con árbol. Se divide la cantidad de hembras atraídas por cada tratamiento (tipo de macho) por la cantidad de machos llamando en cada tratamiento, y determine la media y el error estándar. Esta prueba se puede extender para probar los mismos machos durante días consecutivos evaluando su capacidad de atraer hembras durante períodos de tiempo más largos.

### **Interpretación**

Según la experiencia, se espera que los machos estériles llamen más que los machos silvestres. Si producen cantidades similares de feromona como los machos silvestres, uno esperaría más hembras silvestres en jaulas que contengan machos estériles. Si hay sustancialmente más hembras por macho llamado sobre y cerca de las jaulas de machos silvestres que en las jaulas de machos estériles, puede haber cierta preocupación ya sea que los machos estériles no estén produciendo suficiente feromona o que la composición de feromona haya cambiado. Esto podría afectar la compatibilidad del macho estéril y la hembra silvestres en el campo.

## **7.4. Prueba de la Propensión de las Hembras a la Recópula**

### **Objetivo**

Comparar la receptibilidad de las hembras después de la cópula con machos estériles o silvestres.

## **Discusión**

La recópula en hembras tefrítidas silvestres es más común en la naturaleza de lo que se creía anteriormente. Los estudios han demostrado que, dentro de la familia, el impacto relativo de los principales factores que modulan la renovación de la receptividad de las hembras (i.e., la cantidad de esperma almacenado y las proteínas de las glándulas accesorias) depende de la especie y pueden ser alterados por el proceso de cría masiva y con irradiación. Los machos estériles, en general, son menos capaces que los machos silvestres de suprimir la recópula en las hembras silvestres y este efecto puede aumentar en los machos provenientes de cepas con mayor tiempo de colonización. En consecuencia, la mayor incidencia de recópula entre las hembras que se aparearon con machos estériles en lugar de silvestres puede indicar posibles problemas con la competitividad de los machos.

## **Orige y manejo de las moscas**

Como para la Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo, se requerirán machos adicionales para evaluar la receptividad de las hembras después del primer apareamiento. Si los machos silvestres son escasos, se pueden usar machos de cría masiva fértiles en este punto. Esto asegurará que todos los machos tendrán la misma edad y estado nutricional.

## **Equipo**

- Todo el equipo necesario para la Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo (Sección 6.2).
- Jaulas de apareamiento de laboratorio.
- Microscopio de disección.
- Pinzas de disección.  
Portaobjetos de vidrio y cubreobjetos para colocar las espermatecas disecadas.
- Microscopio para determinar la transferencia de esperma.

## **Procedimientos**

Esta prueba se realiza idealmente como una continuación de la Prueba de desempeño de Cópula en Jaula de Campo (sección 7.2). Cada hembra se identifica después del primer apareamiento y en los días posteriores, se les ofrece nuevos machos vírgenes, y se registra la recópula. Se recomienda que esta parte se realice en condiciones de laboratorio para evitar la dependencia de las condiciones climáticas. Esta sugerencia es válida en general, pero se debe adaptar un protocolo detallado a cada especie. Aquí nuevamente, se debe tener cuidado al recolectar parejas en cópula durante el primer día para asegurarse de que no se vean perturbadas hasta el punto en que se separen prematuramente.

Una vez que las parejas se separan de la primer cópula, las hembras se retiran del vial y se devuelven al laboratorio para colocarlas en un recipiente con agua y alimentos, ya sea solas (1 L, o con otras hembras que se han apareado con machos del mismo tipo (12-20 L). Se debe tener especial cuidado de no mezclar hembras que se aparearon con machos de diferente tipo. Al día siguiente o después de un cierto intervalo de acuerdo con el tiempo medio del período refractario para la especie, si se conoce, se le ofrece a la hembra dos machos silvestres vírgenes sexualmente maduros (o machos de cría masiva si no hay machos silvestres disponibles) por hembra durante el tiempo de actividad sexual para evaluar la receptividad. Las hembras apareadas con machos estériles y las hembras apareadas con machos silvestres deben evaluarse en las mismas condiciones para hacer comparaciones. La tasa de recópula y

el período refractario son las variables a analizar. Se deben ofrecer nuevos machos vírgenes a intervalos regulares (es decir, todos los días o cada dos días) durante un período de al menos dos veces el tiempo promedio del período refractario (si se conoce para las especies de moscas en evaluación). Si es posible, se puede proporcionar un sustrato de oviposición a las hembras y se puede registrar el número de huevos puestos para usar como covariable en el análisis. Si la receptividad de las hembras es muy sensible a la densidad de la mosca, se recomienda realizar la prueba en condiciones relajadas para permitir que las hembras rechacen a los machos.

Si se desea, se puede usar un conjunto de hembras de cada tipo para determinar la incidencia de transferencia de esperma y la cantidad de esperma almacenado. Esto se realiza disectando los órganos de almacenamiento de esperma (dependiendo de la especie, tanto las espermatecas y/o el receptáculo ventral) y colocándolos en un portaobjetos con una gota de solución salina o agua con detergente. Con la ayuda de un alfiler entomológico, los órganos de almacenamiento de espermatozoides se rompen y el material se agita para permitir que los espermatozoides se dispersen. Luego, el portaobjetos se cubre con un cubreobjetos y se registra el número de espermatozoides presentes en un cierto número de campos bajo un microscopio. El número de campos dependerá de la ampliación utilizada, y se recomienda considerar aproximadamente el 10% del área total del cubreobjetos (para más detalles ver Taylor *et al.* 2000; Perez-Staples y Aluja 2006; Abraham *et al.* 2011 y referencias en los mismos).

### **Interpretación**

Para obtener datos significativos, se deben analizar 25 hembras de cada categoría. La tasa de recópula de las hembras que se aparearon por primera vez con diferentes tipos de machos se puede comparar mediante pruebas  $\chi^2$ . Se puede realizar un análisis más preciso utilizando regresión logística múltiple o MANOVA cuando sea apropiado. La duración del primer apareamiento, el origen del macho y otras variables de interés (por ejemplo, estado nutricional, tamaño, exposición a suplementos previos a la liberación, etc.) deben considerarse como los factores principales. Sin embargo, esto requiere un análisis más profundo que puede dejarse para fines de investigación. En total, esta prueba proporciona una idea de la calidad del macho con el que la hembra se apareó por primera vez. Si una hembra apareada por primera vez con un macho estéril tiene una mayor tendencia a aparearse y / o un período refractario más corto que una hembra apareada con un macho silvestre, entonces se puede concluir que el macho estéril es menos capaz de inhibir la receptividad de la hembra. En otras palabras, una mayor incidencia de recópulas entre las hembras que se aparearon con machos estériles frente a machos silvestres sugiere que los machos estériles pueden no transmitir suficiente esperma y/o líquido de las glándulas accesorias a las hembras.

## **7.5. Prueba de Fried en Jaula**

### **Objetivo**

Proveer una estimación de la competitividad general de cópula del macho estéril de moscas de la fruta

## Discusión

El índice de competitividad de apareamiento (C) es el grado de esterilidad producido por los machos estériles en la población silvestre y se mide como una reducción en la eclosión del huevo. La competitividad de apareamiento de los machos estériles influirá en el número de machos estériles necesarios para ser liberados para inducir un grado adecuado de esterilidad en la población silvestre. En la cría masiva hay muchos factores que pueden cambiar la competitividad de apareamiento de un insecto. Fried (1971) consideró que la expresión final de la competitividad de apareamiento podría medirse en la esterilidad del huevo inducida en la población. Presentó un modelo para determinar la competitividad de apareamiento utilizando diferentes proporciones de machos estériles a machos silvestres. Esto fue adaptado en una prueba para la competitividad de cópula y posteriormente se ha llamado la Prueba de Fried. La prueba de Fried se ha realizado en jaulas de laboratorio / campo (y experimentos de campo abierto) durante muchos años en algunas plantas de cría y puede incluirse como un seguimiento de la prueba de desempeño de cópula. Básicamente consiste en comparar el porcentaje de eclosión de huevos obtenido en jaulas donde los machos estériles compiten con machos silvestres del obtenido en jaulas donde solo se liberan moscas silvestres en condiciones de campo. La prueba no se usa ampliamente dada la dificultad de obtener huevos en las jaulas. Por esta razón, en esta nueva versión del manual incluimos una variación en la que las hembras son devueltas al laboratorio después de permitirles aparearse libremente con cualquier tipo de machos durante unos días y los huevos se recogen en el laboratorio. Aunque esta prueba se considera una prueba auxiliar, se recomienda encarecidamente realizarla junto con la Prueba de Desempeño de Cópula en Jaula de Campo de (sección 6.2) siempre que sea posible.

## Origen y manejo de las moscas

### *a) Moscas silvestres y machos estériles:*

Como en la prueba de desempeño de copula en jaula de campo (sección 6.2), pero no es necesario marcar (pintar) las moscas si la prueba puede ejecutarse separada en otra jaula.

### *b) Hembras fértiles de cría masiva:*

Se colocan varios miles de pupas no irradiadas y sin marcar en una taza dentro de una jaula de malla o plexiglás, y se separan los sexos a las pocas horas de emerger. Después, hay que mantener las moscas hasta la madurez sexual (**Cuadro 7.1**) en jaulas de laboratorio (malla o plexiglás) que contengan una fuente adecuada de alimentos y humedad (e.g., agua y una mezcla de proteínas: sacarosa).

## Equipo

- Jaula de campo al aire libre con un árbol hospedero, como para la prueba de desempeño de cópula.
- Substrato de oviposición, esferas de agar envueltas con parafilm o fruto hospedero maduro (libre de huevos de tefrítidos).
- Jaulas de oviposición de laboratorio.
- Microscopio de disección.
- Pinzas de disección.
- Cajas de Petri y esponja de tela para incubar los huevos para el desarrollo embrionario y evaluación de la eclosión del huevo.

## **Procedimientos**

### ***a) Prueba de competitividad en jaula de campo:***

Antes de la prueba de la jaula de campo (al menos el día anterior), las moscas se transfieren a contenedores adecuados para liberarlas en jaulas de campo en grupos de 20 o 40 moscas por contenedor (las moscas deben recibir alimento, agua y ventilación en los contenedores). El día de la prueba, se liberan a los machos silvestres y machos estériles con hembras silvestres en la jaula de campo. Ajuste la cantidad de moscas y la relación estéril: silvestre según la especie como en la prueba de jaula de campo de desempeño de cópula. Agregue comida y agua a la jaula de campo durante la duración de la prueba. Las moscas se liberan antes del inicio del cortejo y se observa el llamado del macho y el inicio de la cópula, se permite que las moscas se apareen libremente. Durante el primer día de la prueba, se agregan 16 sustratos de oviposición a la jaula de campo, colgándolos en el árbol frutal en ocho puntos equidistantes y en 2 niveles diferentes en el árbol.

### ***b) Jaula de campo control:***

En otra jaula se liberan machos silvestres sexualmente maduros y hembras silvestres sexualmente maduras también, con comida y agua. El apareamiento se debe confirmar de que las moscas se apareen libremente como en la jaula de competitividad. Los sustratos de oviposición se agregan a la jaula al mismo tiempo como se describe arriba.

### ***c) Jaula de prueba de esterilidad:***

Los machos estériles sexualmente maduros y hembras de laboratorio fértiles sexualmente maduras se liberan en una jaula de oviposición con alimento y agua. Los sustratos de oviposición se agregan a la jaula al mismo tiempo que en la jaula de campo. Las moscas se deben aparear libremente y se agregan también los sustratos de oviposición. Esta jaula se puede colocar en el laboratorio si es necesario y el propósito es determinar la esterilidad lograda con la irradiación (prueba de esterilidad). Las jaulas con machos y hembras fértiles de laboratorio son para asegurar que la ausencia de eclosión de huevos sea el resultado del proceso de irradiación.

La prueba se realiza durante 4 días, a las 48 horas después de colocar las moscas en las jaulas de campo respectivas, las esferas de agar con huevos se reemplazan con un nuevo conjunto de esferas. Las esferas con huevos se disecan después de sacarlas de la jaula. Los huevos de las esferas se colocan sobre papel filtro negro humedecido en una caja de Petri de 9 cm. Los huevos se incuban a 25 ° C, y después de 5 días se evalúa el porcentaje de eclosión del huevo. Para obtener datos significativos se requieren al menos tres réplicas de esta prueba con tres lotes de machos estériles. Si se recuperan pocos huevos de las jaulas de campo, hay que retirar las hembras de la jaula y transferirlas al laboratorio para proporcionar mejores condiciones (i.e., temperatura) y mejorar el comportamiento de la oviposición. Para obtener datos significativos, se deben recuperar al menos 25 hembras de cada jaula de campo sin colocar machos en las jaulas de oviposición en el laboratorio. Este procedimiento debe realizarse al menos 3 días después de la liberación de la mosca en las jaulas de campo. Una vez en el laboratorio, se proporcionan a las moscas suficiente comida y agua y el sustrato de oviposición. Después de 48 h, se retiran las esferas de agar, se recogen e incuban los huevos como ya se describió.

## Interpretación

El valor de competitividad de Fried (C) se obtiene usando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{S}{E} \times \frac{Hs-Hc}{Hc-He}$$

En esta fórmula, (S) es el número de machos silvestres en la jaula de competitividad, (E) es el número de machos estériles en la jaula de competitividad, (Hs) es el huevo eclosionado de hembras silvestres en la jaula control, (Hc) es el huevo eclosionado de hembras silvestres en la jaula de competitividad y, (He) es el huevo eclosionado de las hembras de laboratorio en la jaula de esterilidad.

Normalmente, C varía entre 1 y 0. Valores de 1 indican igual competitividad entre machos estériles y silvestres. No es raro registrar valores de más de 1; por lo tanto, las réplicas con valores superiores a 1.1 deben descartarse, y los valores entre 1 y 1.1 deben redondearse a 1.0. Los valores entre 0.2 y 0.4 son normales para machos de laboratorio estériles.

## 7.6. Prueba de Fried en Campo

### Objetivo

Proveer una estimación de la esterilidad inducida en el campo por los machos estériles.

### Discusión

La medida final del desempeño de los machos estériles liberados es la reducción de la eclosión de los huevos en la población objetivo. La prueba Fried a nivel de jaula de campo (7.5) proporciona una buena estimación de dicha inducción de esterilidad. Sin embargo, es posible evaluarlo con más detalle y directamente desde el campo recuperando hembras vivas silvestres vivas y permitiéndoles ovipositar para recolectar sus huevos. Esto se puede hacer colocando trampas con atrayentes para hembras que las retengasn en las trampas pero sin matarlas. Las trampas se debe atender periódicamente, y las hembras capturadas se llevan al laboratorio para permitirles ovipositar. También es posible colocar dispositivos de oviposición en las trampas para que las hembras depositen los huevos una vez dentro de las mismas (ref.). El porcentaje de eclosión de los huevos se puede comparar con el obtenido de hembras capturadas en áreas donde no se liberan machos estériles. Para el caso de *C. capitata*, se ha encontrado que la fertilidad de las hembras silvestres en esas áreas puede llegar al 90%. En áreas bajo liberaciones de la TIE, donde la población silvestre es baja, la recuperación de las hembras silvestres puede ser muy baja, y la prueba requerirá mucho trabajo con probablemente pocos resultados.

### Equipo

- Trampas cebadas con atrayentes para hembras apropiadas para las especies que están siendo evaluadas. Si ningún atrayente para hembras está disponible, use atrayentes alimenticios basados en proteínas.
- Substrato de oviposición, esferas de agar forradas con parafilm o frutos hospederos maduros (libres de huevos de tefrítidos).
- Microscopio de disección.
- Pinzas de disección.

- Jaulas de oviposición de laboratorio.

### **Procedimientos**

Seleccione un área donde se realizan liberaciones estériles y un área cercana donde no se liberan moscas estériles, donde se sabe que la población silvestre se encuentra en grandes cantidades. Si no hay un área disponible, configure una jaula de control como en la Prueba de Fried estándar con moscas silvestres. Establezca una cuadrícula de trampas como en la Prueba de liberación y recaptura o aproveche la red de trampeo ya establecida por el programa de acción. Las trampas no deben contener insecticida y deben adaptarse para que las moscas que entren en la trampa sean retenidas pero no muertas. Proporcione una solución de agua y azúcar con una mecha de algodón para nutrir a las moscas. Preste especial atención para colocar las trampas en áreas con follaje para que las trampas no se expongan directamente al sol. Revise las trampas todos los días y con la ayuda de un aspirador retire las hembras, llévelas al laboratorio y colóquelas en jaulas de oviposición con condiciones adecuadas para estimular la puesta de huevos. La fruta natural puede estimular la oviposición pero la recolección de huevos será más laboriosa; los domos artificiales o las esferas de agar pueden ser sustratos de oviposición de menor calidad pero los huevos se colectan fácilmente. Los huevos se recogen diariamente y se colocan en papel de filtro negro humedecido en una caja de Petri de 9 cm, se dejan incubando a 25 ° C y después de 5 días se evalúa el porcentaje de eclosión del huevo. Para obtener datos significativos, se recolectan al menos 30-50 hembras durante un período de una semana y la prueba se repite al menos tres veces durante tres meses (preferiblemente cuando la población silvestre está en su pico más alto). La fruta natural puede estimular la oviposición pero la recolección de huevos será más laboriosa; los domos artificiales o las esferas de agar pueden ser sustratos de oviposición de menor calidad pero los huevos se colectan fácilmente. Los huevos se recogen diariamente y se colocan en papel de filtro negro humedecido en una caja de Petri de 9 cm, se dejan incubando a 25 ° C y después de 5 días se evalúa el porcentaje de eclosión del huevo. Para obtener datos significativos, se recolectan al menos 30-50 hembras durante un período de una semana y la prueba se repite al menos tres veces durante tres meses, preferiblemente cuando la población silvestre está en su pico más alto.

### **Interpretación**

Se calcula el valor de competitividad de Fried (C) como se describe en 7.5 utilizando los datos de un área sin liberación de machos estériles como valores de control o reemplazándolo por estimaciones obtenidas de una jaula de campo con moscas silvestres. La interpretación de los valores de C debe hacerse como se explica para la Prueba de Jaula de Fried. La principal ventaja de esta prueba es que proporciona la medida más precisa de esterilidad inducida en el campo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, esta prueba es adecuada cuando la población silvestre todavía está en niveles altos en el área con liberación de insectos estériles. Una desventaja para algunas especies es la falta de atrayentes específicos para hembras. Esto puede dar lugar a que los machos también entren en la trampa, lo que podría generar apareamientos. Esto puede minimizarse colocando las trampas en el campo a las horas del día cuando las moscas no están sexualmente activas y retirándolas antes del inicio de la actividad sexual (i.e., al final de la tarde para *C. capitata*, desde el mediodía hasta el anochecer para *A. fraterculus*, o desde el amanecer hasta la tarde para algunas especies de *Bactrocera*).

Se puede obtener información adicional sobre cómo se desempeñan los machos estériles en el campo caracterizando los espermatozoides presentes en las espermatecas de las hembras silvestres con técnicas de ADN (refs San Andres y Sabater). Esta herramienta ha demostrado ser muy sensible y es posible determinar el origen del esperma si la hembra se ha apareado con un macho estéril, un macho silvestre o con un macho de cada tipo. Sin embargo, para distinguir el esperma entre ambos tipos de machos, esta técnica requiere que las moscas estériles tengan un fondo genético diferente al de la población silvestre objetivo, o existan marcadores moleculares de diagnóstico específicos. Esta determinación puede consumir mano de obra y requiere enviar el material a laboratorios que puedan realizar el análisis.

## **7.7. Supervivencia en Jaulas de Campo**

### **Objetivo**

Determinar la supervivencia de los machos estériles bajo condiciones de jaula de campo en ausencia de depredadores.

### **Discusión**

Los insectos estériles que se liberan en el campo deben sobrevivir para lograr aparearse con hembras silvestres. Por lo tanto, su supervivencia es uno de los componentes más importantes para el éxito de la TIE. Esta prueba complementa a las ya presentadas en las Pruebas periódicas requeridas, y está diseñada para documentar la supervivencia del macho estéril en condiciones de campo con el fin de poder modificar y/o mejorar los procedimientos de producción y manejo, así como la periodicidad de las liberaciones.

La prueba se realiza en el área de liberación con tubos de PVC dentro de pequeñas jaulas de campo (1.5 x 1 x 1 m) con una malla fina. Una cremallera en el piso de la jaula (**Figura 7.3**) permite la introducción de una planta en maceta de la especie deseada (e.g., planta de café). Siempre que sea posible, se recomienda que estas plantas sean de la misma especie que en áreas donde se liberan los machos estériles. Las plantas en macetas se deben colocar al aire libre bajo las mismas condiciones del área de liberación. Esto permitirá la provisión de excrementos de pájaros, melaza y otras fuentes de nutrición que los machos estériles normalmente encontrarán en el campo. Antes de la prueba, las plantas en macetas se introducen en las jaulas. Se debe hacer un gran esfuerzo para asegurar que no haya depredadores en las plantas en maceta y que la jaula esté bien cerrada para evitar la entrada de depredadores durante la prueba. Las jaulas de campo pequeñas se pueden colocar en ubicaciones que son representativas del rango de condiciones en el área de liberación. En todas estas condiciones, esta prueba debe aproximarse estrechamente a la supervivencia de los insectos en el campo, aunque excluye los efectos de la depredación.

### **Origen y manejo de las moscas**

En este caso se recomienda que las liberaciones en las jaulas de campo pequeñas utilicen moscas recuperadas de la máquina de liberación como en la Prueba post-liberación de adultos voladores (ver sección 5.4.1). Si también se van a liberar moscas silvestres en las jaulas, entonces los procedimientos deben parecerse a los de la Prueba desempeño de cópula en jaula de campo de (sección 6.2).





**Figura 7.3** Jaula de campo que muestra cremalleras en ambos lados y debajo de la jaula (apertura inferior) que se utiliza para introducir una planta en maceta. Las aberturas laterales se utilizan para facilitar el acceso para recoger los insectos estériles muertos.

### **Equipo**

- Tubos de PVC dentro de jaulas pequeñas de campo (1.5 x 1 x 1 m) con una cremallera para permitir el acceso a la jaula.
- Plantas en macetas, preferiblemente de la misma especie de áreas donde se liberan los machos estériles.
- Formas de registro.

### **Procedimientos**

Coloque las jaulas en la ubicación de campo deseada (**Figura 7.4**) y recupere los machos estériles de la máquina de liberación como en la Prueba de post-liberación de adultos voladores. Libere las moscas dentro de las jaulas (100 moscas / jaula). Las pruebas se pueden realizar solo con machos estériles o como poblaciones mixtas de machos estériles y silvestres. Después de 48-72 h (según la especie) se abren las cremalleras laterales y se registra el número de moscas muertas en el formulario. Es aconsejable registrar las condiciones climáticas a intervalos regulares (una vez por hora) colocando registradores de datos dentro de las jaulas.



**Figura 7.4** Un grupo de 10 jaulas de campo manejadas por una sola persona. Las pruebas se llevan a cabo en una finca cafetera.

### **Interpretación**

Las curvas de sobrevivencia se realizan con los datos registrados para determinar el tiempo medio de sobrevivencia y el porcentaje de moscas vivas en tiempos determinados. Si se liberan machos estériles y silvestres juntos entonces se pueden hacer comparaciones de los valores obtenidos. Esta prueba se puede ejecutar como parte de la prueba de control de sobrevivencia en la Prueba de Liberación y Recaptura de Sobrevivencia y Dispersión (ver sección 6.3). También es posible ajustar la frecuencia con la que se revisan las jaulas y hacerlo más de una vez durante la prueba (e.g., cada 12 o 24 h) o durante un período más largo (e.g., una semana). Otras preguntas interesantes que se pueden abordar con esta prueba son el efecto de la dieta administrada a los machos antes de la liberación, el impacto en la sobrevivencia de cualquier tratamiento previo (potenciadores masculinos, metopreno, etc.) y el impacto de la liberación en en sí (enfriamiento, manejo, etc.).

## **7.8. Diámetro de Pupa**

### **Objetivo**

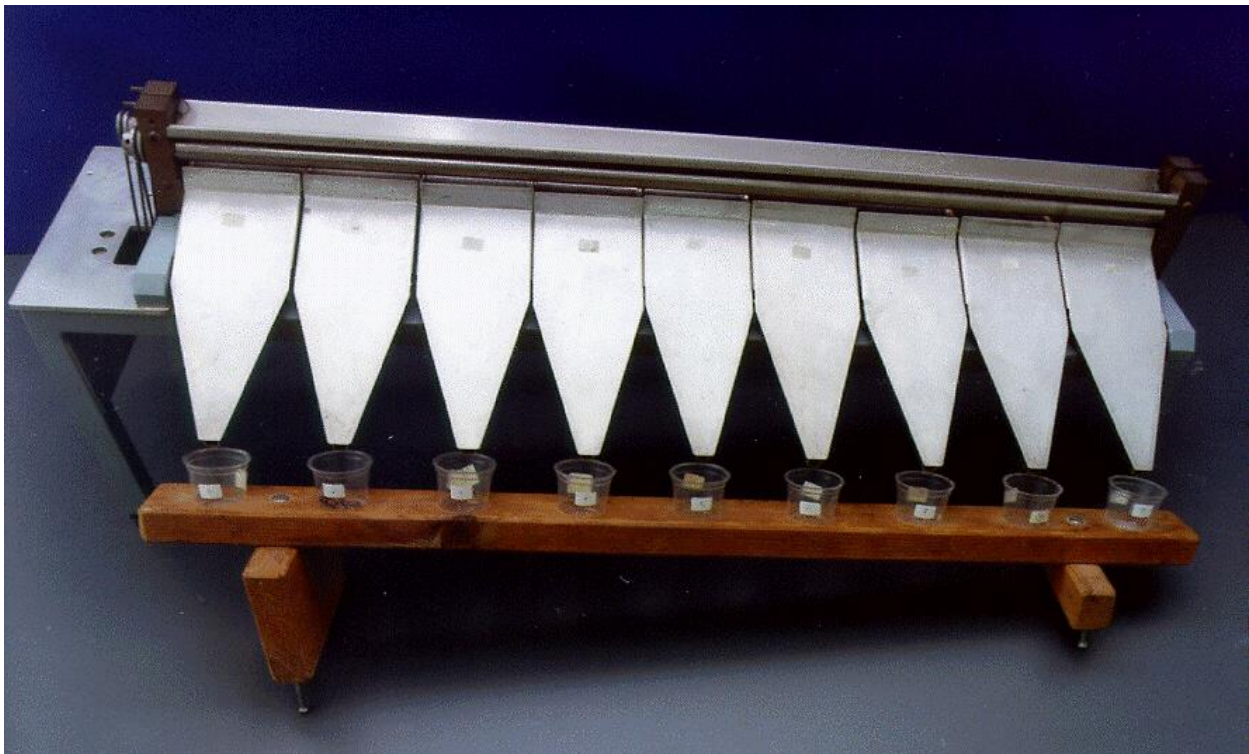
Obtener una estimación precisa del tamaño medio (diámetro) de un grupo de pupas.

### **Discusión**

El diámetro es un indicador valioso de la viabilidad general de las pupas y se correlaciona con el tamaño de las moscas adultas resultantes. Los tefritidos machos más grandes, en general, serán mejores voladores, vivirán más tiempo, tendrán una mayor propensión a la cópula e inducirán períodos refractarios más largos en las hembras que los machos más pequeños. Los valores medidos del diámetro medio de la pupa variarán según el sistema de cría, por lo que el uso del diámetro para comparar la calidad general de las pupas de diferentes plantas debe realizarse con precaución. Esta evaluación debe llevarse a cabo en la planta de cría masiva.

## Equipo

- Balanza o escala con una precisión de  $\pm 1$  mg o menor (**Figura 2.1**, sección 2.2.1).
- Pinzas suaves para el manejo de las pupas y para remover basura de las muestras.
- Tablero con crestas o surcos, u otro dispositivo para simplificar el proceso de contar pupas (opcional).
- Máquina separadora de pupa por tamaño. Consiste en dos cilindros de acero inoxidable divergentes que giran en direcciones opuestas de manera que la parte superior de cada cilindro se separa del otro cilindro (**Figura 7.5**). Los cilindros están en una pendiente y alineados para que haya un espacio de ensanchamiento entre ellos a través del cual las pupas eventualmente caerán a medida que se mueven por la pendiente. Los cilindros se pueden ajustar para regular la velocidad a la que se ensancha el espacio, de modo que sea posible recoger las pupas en hasta 9 grupos de diferentes diámetros, siendo el número ° 1 en la parte superior de la inclinación el más pequeño y el número ° 9 en la parte inferior, el más grande. Se puede usar un vibrador para entregar pupas individualmente al espacio en el extremo de cada cilindro.
- Contenedores pequeños de recolección debajo de cada una de las rampas de la máquina separadora.
- Contador de semillas óptico (opcional). Se puede usar un contador óptico (**Figura 2.2**, sección 2.2.1) para contar pupas en esta prueba, pero se debe calibrar para garantizar la precisión.



**Figura 7.5** Dimensionador de pupas y máquina de separación.

## Procedimiento

Se selecciona volumétricamente una muestra de 500-1,000 pupas del lote a medir y se pasa a través de la máquina separadora. Se debe ajustar el vibrador o, si no se usa un vibrador se debe tener especial cuidado para que las pupas caigan de manera individual sobre los cilindros

y no se "agrupen" mientras descienden por la pendiente. A medida que se cuentan las pupas recolectadas en cada grupo, se deben examinar y descartar las que estén pegadas o que tengan restos adheridos. Se registran los números de pupas en cada grupo y se calcula el porcentaje de pupas en cada rango de diámetro. Las pupas deben provenir de muestras tomadas dos días antes de la emergencia del adulto.

El ancho del espacio entre cilindros desde la parte superior hasta la inferior debe ser diferente para cada especie: El ancho del espacio entre cilindros desde la parte superior hasta la inferior debe ser diferente para cada especie:

<i>C. capitata</i>	1.4 mm a 1.9 mm
<i>A. suspensa</i>	1.8 mm a 2.5 mm
<i>A. obliqua</i>	1.3 mm a 2.9 mm
<i>A. ludens</i>	1.3 mm a 2.9 mm

El espacio debe calibrarse con medidores de espesores automotrices o utilizando brocas del diámetro deseado antes de usarse. Los cilindros también deben estar limpios. El contenido del contenedor correspondiente a las pupas más pequeñas podrá incluir escombros pero pocas pupas, si es que las hay, y se pueden desechar.

### **Interpretación**

Las tendencias a la baja en el diámetro de las pupas producidas por una planta de cría pueden ser resultado de una nutrición deficiente, hacinamiento o altas temperaturas durante la etapa larval. Dado que es probable que el diámetro pequeño vaya acompañado de un rendimiento deficiente en los índices de calidad y en el campo, se deben aplicar cuidadosamente los procedimientos operativos estándar de cría específicos para cada especie.

## **7.9. Supervivencia en Campo**

### **Objetivo**

Estimar la supervivencia en el campo utilizando datos del número de moscas capturadas en la red de trapeo regular del programa operativo.

### **Razonamiento**

Durante la aplicación de la TIE en cualquier programa AW-IPM, se establece una red de trapeo que se inspecciona regularmente para monitorear los niveles de población silvestre. La cantidad de información recuperada es grande, pero a la fecha poco se ha hecho para aprovechar esta información como parte de la evaluación de la calidad de los machos liberados. La prueba propuesta aquí tiene como objetivo cubrir esta brecha incorporando ligeras modificaciones que permiten estimar la supervivencia de un lote de liberación dado.

### **Procedimientos**

Se debe programar que se realicen dos o tres liberaciones consecutivas de moscas teñidas con diferentes colores (Figura 8.xx). Las moscas se deben liberar inmediatamente después del día en que se recibió la trampa. Después de un tiempo suficiente para garantizar que las moscas teñidas con un color diferente estén muertas, se repite el procedimiento. Se registra el número de moscas recuperadas de cada color durante la revisión de la trampa, y se estima la proporción de moscas recuperadas de cada color (rango de edad) en cada revisión de trampa.

## Interpretación

Los datos proporcionarán información sobre la sobrevivencia de las moscas a lo largo de las inspecciones rutinarias de las trampas. También se pueden usar para estimar la ubicación de los machos estériles en el campo, si esto es heterogéneo o no y correlacionarlo con la presencia de las moscas silvestres. Si se realizan suficientes réplicas, cualquier sesgo originado en áreas particulares que sean difíciles o adecuadas para la supervivencia de las moscas, compensará cualquier subestimación o sobreestimación de la sobrevivencia. El impacto estacional en este parámetro también se puede utilizar para ajustar la frecuencia de liberación. La información sobre la distribución de insectos estériles también se puede utilizar para saber si los machos estériles se encuentran en las mismas trampas que las moscas silvestres y si la distribución es heterogénea como respuesta a factores ambientales u otros. Se pueden aplicar diferentes formas de cuantificar la heterogeneidad espacial, como el coeficiente de variación, la autocorrelación espacial, el modelo binomial negativo o el exponente de la ley de potencia de Taylor (ver Meats *et al.* 2006 y referencias).

## 7.10. Literatura Relevante

Complemento de la literatura relevante ya sugerida en las Pruebas Periódicas Requeridas.

**Abraham, S., L. Goane, J.L. Cladera and M.T. Vera. 2011.** Effects of male nutrition on sperm storage and remating behavior in wild and laboratory *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) females. *Journal of Insect Physiology* 57: 1501-1509.

**Fried, M. 1971.** Determination of sterile insect competitiveness. *J. Econ. Entomol.* 64: 869-872.

**Katsoyanos, B. I. and J. Hendrichs. 1995.** Food bait enhancement of fruit mimics to attract Mediterranean fruit fly females. *J. Appl. Ent.* 119: 211-213.

**Katsoyanos, B. I., N. Papadopoulos, N. A. Kouloussi, R. Heath and J. Hendrichs. 1999.** Method of assessing the fertility of wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) females for use in sterile insect technique programs. *J. Econ. Entomol.* 92: 590-597.

**McInnis, D. O. 1989.** Artificial oviposition sphere for Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in field cages. *J. Econ. Entomol.* 82: 1382-1385.

**Pérez-Staples, D., Aluja, M., 2006.** Sperm allocation and cost of mating in a tropical tephritid fruit fly. *Journal of Insect Physiology* 52: 839-845.

**Taylor, P.W., Kaspi, R., Yuval, B., 2000.** Copula duration and sperm storage in Mediterranean fruit flies from a wild population. *Physiological Entomology* 25: 94-99.

**Weldon, C. W., J. Preter and P. W. Taylor. 2010.** Activity pattern of Queensland fruit fly (*Bactrocera tryoni*) are affected by both mass-rearing and sterilization. *Physiol. Entomol.* 35: 148-153

## 8. Formas para Registrar Datos de Control de Calidad

### 8.1. Formulario de Evaluación del Peso de Pupa

Fecha: \_\_\_\_\_

	Fecha de Envío	Lote #	Fechas de muestreo	Fecha de Prueba	Evaluador
<input type="checkbox"/> Pre-Irradiación					
<input type="checkbox"/> Al Arribo					

		Réplicas					
		1	2	3	4	5	Suma
	Pupa Total						
	Peso Total						

Cálculos:

		Valores
	$\left\{ \frac{\sum_{1}^{5} \text{Replicates}}{\sum_{1}^{5} \text{Total Pupae}} \right\}$	Peso promedio <i>(5 muestras)</i>

Observaciones: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Autorización: \_\_\_\_\_

## 8.2. Formulario de Evaluación de Emergencia y Habilidad de vuelo

Fecha: \_\_\_\_\_

- Pre-Irradiación
- Post-Irradiación
- Al Arribo

Fecha de Envío	Lote #	Fecha de Muestreo	Fecha de prueba	Evaluador

Elementos		Replicas					Promedio
		1	2	3	4	5	
<b>T</b>	Número de Pupas						
<b>A</b>	No Emergidas						
<b>B</b>	Parcialmente Emergidas						
<b>C</b>	Deformes						
<b>D</b>	No Voladoras						

Cálculos:

			Valores
<b>E</b>	$T-(A+B)/T*100$	% Emergencia	
<b>F</b>	$(T-(A+B+C+D))/T*100$	% Voladoras	
	<b>F/E</b>	Índice de Vuelo	

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Autorización: \_\_\_\_\_

### 8.3. Formulario de Evaluación de Supervivencia bajo Estrés

Fecha: \_\_\_\_\_

	Fecha de Envío	Lote #	Fecha de Muestreo	Fecha de Prueba	Tiempo de Prueba	Evalua dor
<input type="checkbox"/> Pre-Irradiación						
<input type="checkbox"/> Post-Irradiación						
<input type="checkbox"/> Al Arribo						
<input type="checkbox"/> Post-Manejo/Enfriamiento						
<input type="checkbox"/> Post-Liberación						
<input type="checkbox"/> Post-Manejo/enfriamiento (c/agua)						
<input type="checkbox"/> Post-Liberación (c/agua)						

		Réplicas					
		1	2	3	4	5	Promedio
<b>M</b>	Total de Machos						
<b>MM</b>	Muertos a las 48/72 hrs						
<b>H</b>	Total de Hembras						
<b>HM</b>	Muertas a las 48/72 hrs						

Cálculos:

			Valores
	<b>MM/M*100</b>	% Supervivencia de Machos	
	<b>HM/H*100</b>	% Supervivencia de Hembras	

Observaciones: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Autorización: \_\_\_\_\_



## 8.4. Formulario de Evaluación de la Proporción Sexual y Tiempo de Emergencia

### A) Proporción Sexual

Fecha: \_\_\_\_\_

	Fecha de Envío	Lote #	Fecha de Muestreo	Fecha de Prueba	Evaluador
<input type="checkbox"/> Post-Irradiación					
<input type="checkbox"/> Al Arribo					

<i>Elementos</i>		Réplicas					<i>Promedio</i>
		1	2	3	4	5	
<b>T</b>	Total de Pupas						
<b>M</b>	Machos						
<b>H</b>	Hembras						
<b>A</b>	No Emergidas						
<b>B</b>	Parcialmente Emergidas						

Cálculos:

		Valores
<b>M/(M+F)x100</b>	% Machos	

Observaciones:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Autorización:

\_\_\_\_\_

**B) Tiempo de Emergencia**

Fecha: \_\_\_\_\_

Post-Irradiación

Al Arribo

Fecha de Envío	Lote #	Fecha de Muestreo	Fecha de Prueba	Evaluador

<i>Horas post hipoxia</i>	Réplicas										<i>Suma</i>	
	1		2		3		4		5			
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
0												
8												
16												
<b>24</b>												
32												
40												
<b>48</b>												
56												
64												
<b>72</b>												

Cálculos:

	24 horas	48 horas	72 horas
Acumulado de emergencia de machos a:			
Acumulado de hemergerencia de hembras a:			

Observaciones: \_\_\_\_\_

Autorización: \_\_\_\_\_

## 8.5. Formulario de Evaluación de Esterilidad

Fecha: \_\_\_\_\_

Post Irradiación

al Arribo

	Fecha de Envío	Lote #	Fecha de muestreo	Fecha de Prueba	Evaluador

Dia de Colecta de Huevos		Réplicas		
		Control	Control de Esterilidad-Macho	Control de Esterilidad-Hembra
<b>1</b>	Número de Huevos			
	No Eclosionado			
<b>2</b>	Número de Huevos			
	No Eclosionado			
<b>3</b>	Número de huevos			
	No Eclosionado			
<b>4</b>	Número de huevos			
	No Eclosionado			
<b>5</b>	Número de huevos			
	No Eclosionado			
<b>Total</b>	<b>Número de Huevos (H)</b>			
	<b>No Eclosionado (NE)</b>			

Cálculos:

		Control	Macho	Hembra
	<b>NE/Hx100</b>	% Esterilidad		

Observaciones:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Autorización:

\_\_\_\_\_

## 8.6. Formulario de evaluación de Desempeño de Cópula

Día: \_\_\_\_\_ Observador/s: \_\_\_\_\_

Tratamiento: \_\_\_\_\_ Jaula: \_\_\_\_\_ Tipo de árbol: \_\_\_\_\_

Hora de liberación machos: \_\_\_\_\_ Hora de liberación hembras: \_\_\_\_\_ Hora de terminación: \_\_\_\_\_

Tipo de moscas	Edad de liberación	Color	N <sup>1</sup>	Condición <sup>2</sup>
Macho silvestre				
Macho estéril				
Hembra silvestre				
Hembra estéril				

<sup>1</sup>Indique el número exacto de moscas efectivamente liberadas en la jaula considerando reemplazos. <sup>2</sup>Aquí indique cualquier información relevante respecto a la condición y / o tratamiento de pre-liberación, como el número de lote, la fecha de envío, la fecha de colecta, hospedero (moscas silvestres), dieta, el uso de potenciadores (GRO, metil eugenol) o el tratamiento hormonal ( metopreno), enfriamiento, etc.

Par #	Hora de inicio	Hora Final	Pareja de Cópula <sup>1</sup>		Localización			Observaciones
			Macho	Hembra	Elevación	Follaje	Cuadrante	
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								

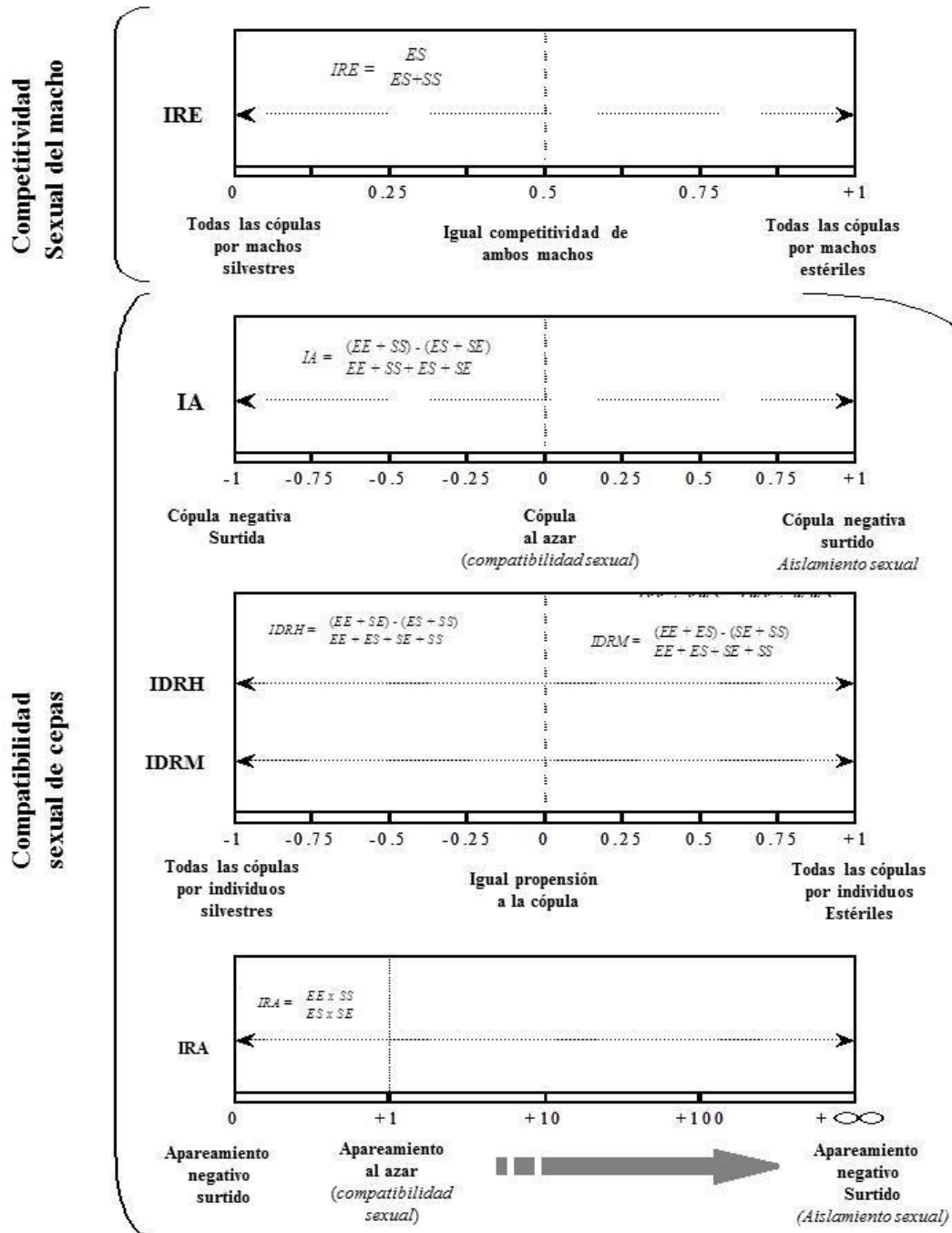
<sup>1</sup>Clave de pareja en cópula: un par siempre está representado primero por el macho y segundo por la hembra. Cuando se registre el tipo de mosca, escribir el color de la misma; pero sin indicar el origen. <sup>2</sup>Clave de Ubicación: Altura de la cópula dentro del árbol en Alta, Media y Baja; Posición dentro del follaje (hoja): Debajo o Sobre la hoja o la Jaula; y cuadrante: NE, NW, SW y SE para los cuadrantes noreste, noroeste, suroeste y sureste, respectivamente.

$\Sigma SS$	$\Sigma SW$	$\Sigma WS$	$\Sigma WW$

Observaciones: \_\_\_\_\_

## 8.7. Representación Gráfica de los Índices de Desempeño de Cópula

Se recomienda la siguiente forma gráfica para representar los valores de los índices de desempeño de cópula obtenidos de la prueba de campo de desempeño de cópula de una manera relativamente autoexplicativa. Mientras que el IRE mide la competitividad sexual del macho, el IA (con IDRH y IDRM) y el IRA proporcionan información sobre la compatibilidad sexual (o aislamiento) entre dos cepas. Cabe señalar que IA, IDRH e IDRM siempre deben interpretarse y presentarse juntos, ya que su significado es complementario. Los datos deben trazarse en cada gráfico como media  $\pm$  error estándar).



## 8.8. Formulario de Evaluación de Irritabilidad de Moscas

Día: \_\_\_\_\_ Observador/es: \_\_\_\_\_

Jaula: \_\_\_\_\_ Tipo de árbol: \_\_\_\_\_ Hora de liberación de las moscas: \_\_\_\_\_

Tipo de mosca	Edad de liberación	Color <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Condición <sup>3</sup>
Macho silvestre				
Macho estéril				
Hembra silvestre				
Hembra estéril				

<sup>1</sup>Las moscas deben ser pintadas con polvo fluorescente para evitar sesgos durante la prueba.

<sup>2</sup>Indica el número exacto de moscas efectivamente liberadas en la jaula considerando los reemplazos.

<sup>3</sup>Aquí indica cualquier información relevante relacionada con las condiciones de confinamiento pre-liberación y/o como el # de lote, fecha de envío, fecha de colecta, hospedero (para moscas silvestres), dieta, uso de potenciadores (GRO, methyl eugenol) o tratamiento hormonal (methopreno), enfriamiento, etc.

Period de muestreo	# Machos silvestres	# Machos esteriles	# Hembras silvestres	# Machos esteriles
Temprano / mañana				
Mediodía				
Anocheecer				

Observaciones: \_\_\_\_\_

## **Apéndice A: Cronología del Control de Calidad del Producto de Moscas Tefritidas para su Uso en Programas TIE**

- 1977 Publicación de “An Idea Book for Fruit Fly Workers” (Boller y Chambers 1977), el cual incluye muchos artículos originales y referencias bibliográficas sobre como medir el desempeño en general, razgos individuales y la producción de tefrítidos criados en laboratorio.
- 1978 El Grupo de Trabajo Paleártico de la IOBC sobre Moscas de la Fruta de Importancia Económica se reunió en Sassari, Cerdeña, Italia, donde se propuso el control de calidad de las moscas de la fruta tefrítidas como una disciplina.
- 1978 Boller, Calkins, Chambers, Cunningham, Greany, Hendrichs, Huettel, Leppla y Ruhm se reunieron en Guatemala bajo el auspicio de la AIEA, USDA, ARS y Moscamed para conducir pruebas de laboratorio y campo de control de calidad con moscas de laboratorio y campo.
- 1979 Se describe el sistema de apareamiento Lek en la mosca del Mediterráneo (Prokopy y Hendrichs 1979). La Organización Internacional de Control Biológico (IOBC) patrocina un curso en Castellón, España y un manual (Calkins *et al.* 1979) para cubrir los métodos para evaluar el tamaño de pupa, la capacidad de vuelo, la actividad de sobresalto, la olfatometría, la propensión a la cópula, la dispersión y la supervivencia, y las pruebas de proporción.
- 1981 Publicación de los métodos y equipos de RAPID para "Medición, monitoreo y mejoramiento de la calidad de las moscas de cría masiva" (Boller *et al.* 1981). Esta publicación sugiere que se realicen cinco pruebas, i.e., tamaño de la pupa, capacidad de vuelo, actividad de sobresalto, respuesta a la feromona y la propensión a la cópula, a intervalos frecuentes.
- 1981 Un grupo técnico internacional sobre control de calidad se reúne en Guatemala para estandarizar métodos y pruebas básicas. Se recomiendan seis pruebas que deben realizarse regularmente y otras nueve según lo permitan el tiempo y los recursos (Klee 1981). Se incluyeron procedimientos y formularios de los informes que se usarían.
- 1982 Primera prueba de compatibilidad de cópula en un árbol hospedero en jaula de campo, midiendo la elección de las hembras silvestres entre machos silvestres y estériles que compiten (Zapfen *et al.* 1983).
- 1982 Se formó el Grupo de trabajo global de la IOBC sobre control de calidad de insectos criados masivamente. La primera reunión se celebró en Gainesville, Florida, EE. UU. Reuniones posteriores se llevaron a cabo en Wadenswil, Suiza en 1984, en Ciudad de Guatemala, Guatemala en 1986, en Vancouver, Canadá, en 1988, Wageningen, Países Bajos, en 1991 en Rimini, Italia en 1994, y en Santa Bárbara, California, Estados Unidos en 1996.
- 1982 El Simposio Internacional sobre Moscas de la Fruta de Importancia Económica tuvo una sección sobre Control de Calidad, en Atenas, Grecia. También se celebró en 1986 en Creta, 1990 en Antigua, Guatemala y 1994 en Clearwater, Florida, EE. UU.
- 1983 Chambers *et al.* (1983) publican las pruebas de campo para extender y confirmar los resultados de los datos de laboratorio de las pruebas RAPID. El personal del Programa

Moscamed en México publica un manual de más de 40 pruebas de laboratorio y de campo que se han utilizado ampliamente para medir la calidad de las moscas producidas masivamente en América Latina (Orozco et al. 1983).

- 1984 El USDA, el OIEA y Moscamed Guatemala establecen una prueba piloto cooperativa de un proceso sistemático basado en las pruebas RAPID, para medir y controlar la calidad a través del control de procesos, la evaluación del producto y el manejo de datos. Carol Calkins y T. Ashley desarrollaron un manual para el control de calidad de laboratorio de la mosca del Mediterráneo criada masivamente.
- 1986 El USDA-APHIS compila y distribuye "Pruebas requeridas de control de calidad, especificaciones de calidad y procedimientos de envío" (Brazzel et al. 1986). Este manual fue diseñado para garantizar que las moscas del Mediterráneo para programas TIE con participación del USDA cumplan con ciertos estándares de calidad. Las pruebas de control de calidad incluidas eran principalmente una verificación del proceso de cría y todas podían llevarse a cabo con equipos económicos (o de fácil construcción) en un mínimo de espacio de laboratorio. Esta ha sido la guía de control de calidad que se ha seguido en las plantas de cría del USDA, Moscamed y CDFA durante los últimos 10 años.
- 1989 Hibino e Iwahashi (1989, 1991) documentan un caso de resistencia conductual (al apareamiento con moscas estériles) para la mosca del melón en las islas Okinawa. Posteriormente se informó un caso dudoso para la mosca del Mediterráneo en Hawaii (McInnis et al. 1996).
- 1994 La Sección de Control de Plagas de Insectos de la División Conjunta FAO / OIEA para la Alimentación y la Agricultura lanza un Proyecto de Investigación Coordinada para estudiar el cortejo de las moscas del Mediterráneo y los comportamientos de elección las hembras, para evaluar la compatibilidad entre poblaciones de la mosca del Mediterráneo de diferentes orígenes en todo el mundo, y para estandarizar las pruebas de compatibilidad de cópula en jaula de campo.
- 1996 Se publican los índices (RII, RSI) para medir la competitividad de apareamiento en la prueba de jaula de campo (McInnis et al. 1996).
- 1997-98 Diecinueve expertos de varios países se reunieron en Viena durante una semana para armonizar internacionalmente el control de calidad del producto en moscas de la fruta, y para acordar el manual de "Procedimientos de control de calidad del producto, irradiación y envío para moscas de la fruta tefritidas criadas en masa para programas de liberación de insectos estériles". El manual de la FAO / OIEA / USDA de "Procedimientos de control de calidad del producto, irradiación y envío de moscas de la fruta tefritidas criadas en masa para programas de liberación de insectos estériles" (Versión 4) se publica en septiembre y se reconoce como una directriz internacional para proyectos de TIE de moscas de la fruta.
- 1999 Se publican nuevos índices (ISI, MRPI, FRPI) para medir la competitividad de cópula en la prueba de jaula de campo (Cayol et al. 1999). Estos índices se incluyeron en la Versión 4.0 del presente manual. La Sección de Control de Plagas de Insectos de la División Conjunta FAO / OIEA para la Alimentación y la Agricultura lanza un Proyecto de Investigación Coordinada sobre "Garantía de calidad de moscas de la fruta



- producidas y liberadas en masa" con el objetivo de mejorar y estandarizar aún más los procedimientos internacionales de control de calidad.
- 2003 El manual FAO / OIEA / USDA de "Control de calidad del producto y procedimientos de envío para moscas de fruta tefritidas criadas en masa estériles" se revisa como Versión 5 y se publica. El manual revisado incluye las pruebas requeridas de competitividad y compatibilidad de cópula. Además, se agregaron pruebas para proporcionar mejor información sobre la sobrevivencia y dispersión de moscas estériles en el campo.
- 2005 Se publicó el libro "Técnica del Insecto Estéril. Principios y prácticas en el manejo integrado de plagas en áreas amplias". Este libro contiene un capítulo sobre control de calidad. La Parte III titulada "Componentes tecnológicos de la técnica del insecto estéril" contiene partes relacionadas con el comportamiento, la cría masiva, la esterilización con radiación ionizante, la calidad de los insectos estériles, la emergencia y liberación de insectos y el monitoreo de insectos estériles / silvestres en un programa de manejo de plagas en áreas amplias.
- 2007 Se termina el proyecto coordinado de investigación FAO / OIEA sobre el aseguramiento de la calidad de moscas de la fruta producidas y liberadas en masa. Los hallazgos se publican como un número especial en el Florida Entomologist. Se puede ver un informe final en: [http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/d41016\\_list\\_pub\\_final.pdf](http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/d41016_list_pub_final.pdf)
- 2007 Se desarrolla y publica un modelo para la optimización de la dosis para el mejoramiento de la calidad de los insectos estériles.
- 2007 La FAO / OIEA publica "Guía para el empaque, envío, confinamiento y liberación de moscas estériles en programas de control de moscas de la fruta en áreas amplias".
- 2007 SAGARPA-SENASICA-Dirección General de Sanidad Vegetal Programa Moscafrut emite un nuevo "Manual de Control de Calidad de moscas esteriles y parasitoides: Procedimientos para evaluar el producto (*Anastrepha ludens*, *Anastrepha obliqua* y *Diachasmimorpha longicaudata*)". Este nuevo manual contiene el control de calidad para insectos estériles y para un parasitoide de moscas de fruta.
- 2007 Se publica el libro "Area-Wide Control Insect Pests: From Research to Field Implementation" editado by M.J.B. Vreysen, A.S. Robinson, J.P. Hendrichs. Este libro contiene capítulos relevantes para los programas TIE y la calidad del insecto estéril.
- 2008 Un panel de expertos lleva a cabo una revisión de todas las plantas de emergencia y liberación de moscas de la fruta apoyadas por el USDA en los Estados Unidos, México y Guatemala. El informe final contiene muchas recomendaciones para mejorar la eficiencia y la efectividad aplicables a los programas de liberación de insectos estériles en general.
- 2009 Se termina el proyecto coordinado de investigación FAO / OIEA sobre el desarrollo de la cría en masa de moscas de la fruta del Nuevo Mundo (*Anastrepha*) y Asia (*Bactrocera*). Los hallazgos se publican como un número especial en el International Journal of Tropical Insect Science. El informe de evaluación final y las actas se publicarán pronto y se puede acceder en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/ipc-mass-rearing.html>.

- 2009 Se termina el proyecto coordinado de investigación FAO / OIEA para mejorar el desempeño de los machos estériles en los programas TIE de moscas de la fruta. Los hallazgos se publican como un número especial en el Journal of Applied Entomology. Se puede ver la lista de publicaciones producidas en este CRP en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/d41020-list-pub-final.pdf> . Un reporte final de la evaluación está disponible en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/crp/d41020-evaluation-report.pdf> .
- 2010 Se completa y se publican los resultados de la investigación relacionada con una nueva generación de irradiadores de rayos X para la esterilización de insectos. Estos irradiadores ofrecen una nueva alternativa a los programas TIE para esterilizar insectos, particularmente cuando ya no es posible transportar y almacenar irradiadores con radioisótopos.
- 2010 Se lleva a cabo una reunión de consultores en el OIEA en Viena, Austria, para revisar el manual de la FAO / OIEA / USDA sobre "Control de calidad del producto y procedimientos de envío para moscas de fruta tefritidas criadas en masa estériles" que se convertirá en la versión 6.0. El nuevo manual se reorganiza en dos partes: a) plantas de cría masiva y b) centros de emergencia y liberación de moscas. Las pruebas periódicas y de rutina requeridas se identifican para cada uno de los procesos principales por tipo de instalación. Las voladoras absolutas después del manejo / enfriamiento y liberación en los centros de emergencia y liberación se agregaron como pruebas de rutina requeridas. El desempeño de cópula en jaulas de campo y la capacidad para evadir depredadores se agregaron como pruebas periódicas en las plantas de cría masiva. Las siguientes pruebas de rutina requeridas fueron renombradas: peso de la pupa (en lugar del tamaño de la pupa); sobrevivencia bajo estrés (en lugar de longevidad bajo estrés). La prueba de apareamiento de laboratorio se eliminó del manual.
- 2015 La reunión de consultores se lleva a cabo en el OIEA en Viena, Austria, para comenzar a revisar el manual de la FAO / OIEA / USDA sobre "Control de calidad del producto y procedimientos de envío para moscas de fruta tefritidas criadas en masa estériles", la cual generará la versión 7 de este manual.

*Nota:* Las referencias citadas en este Apéndice se pueden encontrar en la introducción y otras secciones de este manual.

## Apéndice B: Fuentes Conocidas de Equipos y Suministros Clave<sup>1</sup>

Artículo	Fuente
<b>Como descrito en XX Guía para el muestreo de insectos en pruebas de rutina de CC</b>	
Medidor de rodillos [para separadores del tamaño de pupa, (“puppentransporteinrichtung”)]	<b>Ing. Alfred PARAL</b> Postfach 27, Hainfelder Strasse, A-3071 Boeheimkirchen, Austria. Fax: (+43) 274323045
Contador de Semillas [para el conteo de pupas, ELMOR 600/A05 con tornillo en el tazón del transportador, incluido el conducto de descarga y el actuador de pie]	<b>Dr. Rudolf MOLL</b> Export Department Mangelegg 58, CH-6430 Schwyz, Switzerland. Fax: (+41) 43216508
<b>Como se describe en 0 2.2.2. EMERGENCIA Y HABILIDAD DE VUELO</b>	
Tubos para Habilidad de Vuelo [Tube-Pak, size No. 52D I.D. 3 ¼", O.D. 3 ½", 8 ft length, Part No. 06048C]	<b>Consolidated Plastics Company</b> 9085 Freeway Drive, Macedonia, Ohio 44056, USA.
<b>Como se describe en</b>	
Polvo Day-Glo [ejemplo: Blaze Orange, referencia JST43]	<b>Radiant Color</b> Europarklaan 80, B-3530 Houthalen, Belgium Tel.: (+32) 11520760, Fax: (+32) 11526679 E-mail: info@radiantcolor.be
Jaulas de Campo [20 x 20 HDPE Screen fabric - 2.9 meters diameter x 2.0 meters height with floor and one 2-way zipper (bottom to top)]	<b>Synthetic Industries</b> P.O. Box 977, 2100A Atlanta Highway, Gainesville, Georgia, 30503, USA. Fax: (+1) 7705311347
Medidor de luz y registrador de datos [model Testo 545 (lightmeter) and Testostor 171 (datalogger)]	<b>Testo GmbH &amp; Co.</b> Postfach 11 40, Testo-Strasse 1, D-79853 Lenzkirch, Germany Tel.: (+49) 7653681-0, Fax: (+49) 7653681-100 E-mail: info@testo.de, Website: <a href="http://www.testo.de">www.testo.de</a>
<b>Como se describe en</b>	

<sup>1</sup> Se hace referencia a cualquier producto o servicio comercial con el entendimiento de que no se pretende discriminar y que la FAO / OIEA o el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos no lo respaldan. Se recomienda encarecidamente a los revisores que contribuyan con fuentes adicionales de equipos y suministros.

Artículo	Fuente
Atrayentes [BioLure® Three-Component Fruit Fly Lure (Triple Pack) (trimethylamine, putracine, and ammonium acetate)]	<b>Suterra (formerly Consep, Inc.)</b> 213 S.W. Columbia St., Bend OR 97702-1013, USA. Tel.: (+1) 5413172254, Fax: (+1) 5413883705
Atrayente [cue-lure]	<b>Scentry Biologicals Inc.</b> 610 Central Venue, Billings, MT 59102, USA. Tel.: (+1) 4062485856, Fax: (+1) 4062452790
Atrayente [methyl-eugenol (eugenol methyl-ether)]	<b>American Scientific &amp; Industrial Supplies</b> PO Box 8247, Radnor PA 19087, USA. Tel.: (+1) 6109647665, Fax: (+1) 6109641860 E-mail: sales@asi-supplies.com  <b>Scentry Biologicals Inc. (see above)</b>
Atrayente [torula yeast pellets]	<b>Scentry Biologicals Inc. (see above)</b>
Atrayente [trimedlure]	<b>Better World Manufacturing Inc.</b> 5690 E. Dayton Avenue, Fresno CA 93727, USA. Tel.: (+1) 3055958911, Fax: (+1) 3055957806 E-mail: multilure@aol.com  <b>Scentry Biologicals Inc. (see above)</b>
Lámpara Ultra-Violeta [High Intensity Long-wave. B- 100AP]	<b>Ultra-Violet Products (UVP) Inc.</b> 2066 W. 11th Street, Upland, CA USA. Fax: (+1) 8004526788 or (+1) 9099463197 E-Mail: uvp@uvp.com  European Sales Operations: <b>Ultra-Violet Products Ltd.</b> Science Park, Milton Road, Cambridge, CB4 4FH, United Kingdom. Tel.: (+44) 1223420022 E-mail: <a href="mailto:uvpuk@uvp.com">uvpuk@uvp.com</a>
Lámpara Ultra-Violeta con magnificador [Philalux II HF, Art. 9865]	<b>Schwaebische Albumfabrik GmbH &amp; Co.</b> P.O. Box 60, D-7445 Bempflingen, Germany. Fax: (+49) 712332550

Artículo	Fuente
Trampas y suministros de trampeo	<p><b>Better World Manufacturing Inc. (see above)</b></p> <p><b>Gempler's Pest Management Supply</b> P.O. Box 270, 211 Blue Mounds Rd., Mt. Horeb, WI 53572, USA. Tel.: (+1) 8002727672, Fax: (+1) 8005511128</p> <p><b>Scentry Biologicals Inc. (see above)</b></p> <p><b>Sorygar S.L. (for Tephri® traps)</b> Quinta del Sol n. 37, Las Rozas - Madrid 28230, Spain. Fax: (+34) 916407000 E-mail: sorygar@nexo.es</p> <p><b>Suterra (see above)</b></p>
<b>Como se describe en 0 3.3. IRRADIACIÓN Y CONTROL de Procesos</b>	
Etiquetas sensibles a la radiación específicos de la dosis [70, 125, 300 Gy]	<p><b>International Speciality Products (ISP) Technologies Inc.</b> 1361 Alps Rd, Wayne, New Jersey, 07470, USA. Tel.: (+1) 2016284000, Fax: (+1) 2016283016</p>
<b>Como se describe en</b>	
Gafchromic® dosímetros [type HD-810, package of 5 sheets, 8" x 10 "]	<p><b><u>Elimpex Medizintechnik GesmbH</u></b> <u>Spechtgasse 32, A-2340 Moedling, Austria.</u> <u>Tel.: (+43) 2236410450, Fax: (+43) 2236410459</u> <u>E-mail: falk@elimpex.com</u> <u>(specify "catalog number 37-040")</u></p> <p><b>ISP Technologies Inc. (see above)</b></p>
Sistema de lectura digital Radiachromic® [model FWT-92D-220]	<p><b>Far West Technology Inc.</b> 330 D South Kellogg, Goleta CA 93117, USA. Tel.: (+1) 8059643615, Fax: (+1) 8059643162</p>
<b>Miscelaneos</b>	
Microscopio Fluorescente [trinocular with phase contrast, model VanGuard 1486FL]	<p><b><u>Service for Science and Industry (SFSI) Inc.</u></b> <u>1101 North Kings Highway, Suite 201, Cherry Hill NJ 08034, USA.</u> <u>Tel.: (+1) 8563210635, Fax: (+1) 8563210636</u> <u>E-mail: sfsi@sfsi-usa.com</u></p>
Monitores multiusos de temperatura y / o humedad	<p><b>Temperature Data Systems</b> Wattstraat 68, P.O. Box 168, 2170 Ad Sassenheim, The Netherlands. Tel.: (+31) 0 252211108, Fax: (+31) 0 252231032 Website: <a href="http://www.temperaturedatasystems.com">www.temperaturedatasystems.com</a></p>

## Apéndice C: Terminología

**Glándulas accessorias:** estructuras glandulares asociadas con la espermateca que produce el material que acompaña al espermatozoide durante la eyaculación.

**Adyacente-1:** cepas de sexado genético que tienen un enlace Y, producen una segregación adyacente-1 en la meiosis. Esto produce 2 clases de gametos genéticamente desequilibrados. Una clase se caracteriza por la eliminación de una parte del autosoma unido a Y, mientras que la segunda clase contiene la otra parte del autosoma respectivo por triplicado. En este último, unos pocos individuos sobreviven hasta la edad adulta. Característicamente, individuos adyacentes-1 exhiben menor emergencia. Además, no hay evidencia de que los individuos adyacentes-1 se reproduzcan, pues en la mayoría de los casos son demasiado débiles y poco longevos para aparearse exitosamente.

**Aedeagus:** Órgano sexual masculino para transferir el espermatozoide a las hembras.

**Área:** Un país oficialmente definido, parte de un país, o la totalidad o partes de varios países.

**Apareamiento/cópula selectiva:** Término utilizado para describir la tendencia de machos / hembras de una población para aparearse preferentemente con machos / hembras de la misma población.

**Llamado:** el acto de dispensar feromona por el macho de moscas de la fruta para atraer hembras.

**Certificado:** Un documento oficial que acredite el estado fitosanitario de cualquier envío afectado por regulaciones fitosanitarias.

**Control biológico clásico:** La introducción intencional y establecimiento permanente de un agente de control biológico exótico para el control de plagas a plazo largo.

**Compatibilidad (cópula):** término usado cuando las hembras de una cepa determinada pueden y están disponibles para aceptar y aparearse con machos de otra cepa; esto también incluye sincronía y otros factores que causan “inconformidad” reproductiva.

**Competencia:** interacción entre organismos que comparten un recurso ambiental limitado.

**Competitividad:** capacidad de un organismo para competir con conespecíficos por un recurso ambiental limitado.

**Envío:** una cantidad de plantas, productos vegetales y / u otros artículos biológicos que se trasladan de un país a otro (o de una región de un país a otra) y se amparan, cuando es necesario, con un solo certificado fitosanitario (un envío puede estar compuesto por uno o más productos o lotes).

**Envío en tránsito:** un envío que pasa por un país pero con destino a otro país, sujeto a procedimientos oficiales que aseguran permanezca cerrado, que no se divida, no se combine con otros envíos ni se cambie su embalaje.

**Plaga contaminante:** una plaga que es transportada por una mercancía y, en el caso de plantas y productos vegetales, no infesta esas plantas o productos vegetales.

**Control (de una plaga):** Supresión, contención o erradicación de una población plaga.

**Gráfica de control:** para trazar un parámetro con límites predeterminados en una escala de tiempo y presentar esta información en una forma fácil de interpretar, como en gráficas de promedios o rangos que tienen líneas de límite de control.

**Cópula:** unión sexual.

**Cortejo:** comportamiento de cortejo de los animales machos con la expectativa de apareamiento.

**Data logger:** (Registrador de datos): dispositivo utilizado para registrar temperaturas (o cualquier otra variable ambiental) durante un período de tiempo variable.

**Deformes (alas):** alas de moscas que no están completamente expandidas o que están arrugadas.

**Monitoreo de detección:** encuesta realizada en un área para determinar si hay plagas.

**Periodicidad diaria:** hora del día en que un organismo tiende a exhibir un comportamiento o rasgo.

**Emergencia (emergencia del adulto):** escape del insecto adulto de la cutícula de la pupa.

**Usuario final:** la agencia o personal que usa o libera las moscas recibidas de una entidad productora.

**Entrada** (de una plaga): movimiento de una plaga dentro de un área donde no estaba presente, o está presente pero no ampliamente distribuída y está oficialmente controlada.

**Entrada** (de un envío): movimiento a través de un punto de entrada a un área.

**Erradicación:** Aplicación de medidas fitosanitarias para eliminar una plaga de un área.

**Establecimiento:** Permanencia, en el futuro previsible, de una plaga dentro de un área después de la entrada.

**Exótica:** especie no nativa de un país, ecosistema o área ecológica en particular (aplicado a organismos introducidos intencionalmente o accidentalmente como resultado de la actividad humana). Como este código está dirigido a la introducción de agentes de control biológico de un país a otro, el término "exótico" se usa para organismos no nativos de un país.

**Habilidad de vuelo:** capacidad del adulto de alcanzar un desempeño definido de vuelo.

**Peligro:** elementos o eventos que representan un daño potencial; un evento adverso o resultado adverso (basado en la definición del OIE).

**Peligro** (fitosanitario): daño o efecto deletéreo causado por una plaga a las plantas, productos de las plantas o la salud de las plantas en un ecosistema.

**Incursión:** presencia de una población plaga dentro de un área donde es capaz de causar daños económicos pero no es capaz de establecerse (basado en Art VII.3 del IPPC).

**Certificado de irradiación:** documento presentado por el remitente al importador para certificar que los insectos contenidos en los empaques fueron irradiados a una dosis específica.

**Lek:** un sitio de exhibición comunal donde los machos se agregan con el único propósito de atraer y cortejar a las hembras y a las cuales las hembras acuden para aparearse.

**Lux:** unidad de iluminación igual a un lumen por metro cuadrado. El lumen es aproximadamente 1/683 Watt.

**Pareja de apareamiento:** moscas macho y hembra en cópula. Esto no incluye por obviedad la transferencia de esperma.

**Sistema de cópula:** El proceso de asegurar que los machos y las hembras de una especie dada interactúen sexualmente para la reproducción. En el caso de las moscas de la fruta tefrítidas, es un sistema de elección femenina.

**Mosca no voladora normal:** mosca que aparenta estar normal pero que no vuela.

**Occurrencia:** la presencia en un área de una plaga oficialmente reconocida como nativa o introducida y/o no oficialmente reportada como erradicada.

**Brote:** Una población plaga aislada, recientemente detectada.

**Relación inundativa:** la tasa de moscas estériles en relación con moscas silvestres en una población sujeta a un programa de TIE.

**Parásito:** Un organismos que vive sobre o dentro de un organismo más grande, y se alimenta de él.

**Parasitoide:** Un insecto que parasita solamente estados inmaduros de otros insectos, matando a su hospedero durante su desarrollo y que tiene vida libre como adulto.

**Patógeno:** Micro-organismo que causa enfermedad.

**Plaga:** Cualquier especie, cepa o biotipo de plantas, animales o patógenos que dañe plantas animales o sus productos.

**Análisis de riesgos de plagas:** El proceso de evaluación de evidencias biológicas, científicas y económicas para determinar si una plaga debe ser regulada, y para determinar la fuerza de cualquier medida fitosanitaria que se tome contra ella.

**Evaluación del riesgo de plagas:** evaluación de la probabilidad de introducción y propagación de una plaga y de las posibles consecuencias económicas asociadas.

**Manejo del riesgo de plagas:** Evaluación y selección de opciones de manejo para reducir el riesgo de introducción y propagación de una plaga.

**Estado de la plaga** (en un área): Presencia o ausencia, en tiempo presente, de una plaga en un área, incluyendo cuando corresponda su distribución, según se determine oficialmente utilizando la opinión de expertos sobre la base de registros actuales e históricos de la plaga, y otra información.

**Acción fitosanitaria:** Una operación oficial, como inspección, prueba, vigilancia o tratamiento, realizada para implementar regulaciones o procedimientos fitosanitarios.

**Certificado fitosanitario:** Certificado estructurado después de los modelos de certificados de la CIPF.

**Medida fitosanitaria:** cualquier legislación, reglamento o procedimiento oficial que tenga el propósito de prevenir la introducción y / o propagación de plagas.

**Procedimiento fitosanitario:** cualquier método prescrito oficialmente para implementar regulaciones fitosanitarias, incluyendo la realización de inspecciones, pruebas, vigilancia o tratamientos en relación con plagas reglamentadas.

**Punto de entrada:** aeropuerto, puerto marino, punto fronterizo terrestre oficialmente designado para la importación de envíos, y/o entrada de pasajeros.

**Control del proceso:** regulación del desarrollo de los procesos de producción a través de la retroalimentación para que no se produzcan desviaciones de las límites y especificaciones del producto. Los parámetros dentro del ámbito del control de calidad del proceso para la



producción de moscas de la fruta incluyen, entre otros, porcentaje de eclosión de huevos, huevos por unidad de dieta, cantidad de dieta sembrada, porcentaje de pupación, edad de pupas irradiadas.

**Control de producción:** desarrollo, instalación y mantenimiento de métodos utilizados para producir un producto al mayor ritmo, de la manera más eficiente.

**Control del producto:** las características del producto resultado de la producción y de las pruebas sobre el producto para que cumpla con las expectativas del cliente. Los parámetros de control de calidad del producto para la producción masiva de la mosca de la fruta incluyen, entre otros, el peso de pupa, la proporción de sexos, la sobrevivencia, la capacidad de vuelo, la producción y respuesta de feromonas, la propensión y compatibilidad de apareamiento.

**Feromona:** sustancia química producida por un organismo que influye el comportamiento de otro individuo de la misma especie.

**Parcialmente emergida:** una mosca que no emergió completamente del pupario, mostrando solo la cabeza libre y parte del abdomen.

**Empaque:** el acto de colocar las pupas en un paquete y colocar el paquete en un contenedor antes del envío.

**Propensión:** una inclinación o tendencia; la tendencia de un insecto individual a realizar un acto, o que ocurra un evento individual.

**Calidad:** el grado en que un producto cumple con los requisitos del objetivo o de la función esperada.

**Control de calidad:** un proceso sistemático en el que los gerentes evalúan críticamente los elementos de producción, establecen estándares y tolerancias, obtienen, analizan e interpretan datos sobre la producción y el rendimiento del producto, y proporcionan comentarios para predecir y regular la calidad y cantidad del producto.

**Rango:** el área entre límites de variación, especialmente porque representa un alcance de operación efectiva.

**Recombinación:** el intercambio genético entre dos cromosomas homólogos que conduce a la aparición de recombinantes. En el caso de las cepas de sexado genético, se refiere principalmente a la recombinación en machos que resulta, en la próxima generación, en una inversión del sistema de sexado, es decir, los recombinantes, que son hembras de tipo silvestre o machos mutantes.

**Liberación** (en el ambiente): liberación intencional de un organismo en el ambiente. Ver también introducción y establecimiento.

**Liberación** (de un envío): Autorización para entrar después del despacho.

**Recópula:** cópula nueva de un macho o hembra en algún momento después de una cópula anterior.

**Período refractario:** el período entre apareamientos, generalmente inducido por una sustancia del macho que inhibe el apareamiento de la hembra.

**POEs:** se refiere a varios Procedimientos Operativos Estándar (sin embargo, cada instalación también tiene sus POE para el control de calidad del proceso, etc.) desarrollados por la División Conjunta FAO / OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura. Los POE pueden tener derecho como tales o aparecer en otras publicaciones, como los

manuales de control de calidad, pero deben darse reconocimiento a esta organización internacional.

**Especificaciones:** describen o se ocupan de propiedades que caracterizan un factor utilizado, o para describir un aspecto de calidad.

**Transferencia de esperma:** la transferencia exitosa de espermatozoides de un macho a las espermatecas de una hembra durante la cópula. Esto puede ir acompañado del líquido de la glándula accesoria.

**Estándar:** una calidad o medida que sirve como base o principio por la cual otros conforman o deberían conformar por precisión y/o calidad que se busca.

**Esterilidad** (inducida por la radiación): una condición en la cual los espermatozoides o los óvulos de individuos irradiados no producen descendencia fértil.

**Cepa:** una raza o conjunto de moscas de la fruta que se han mantenido en colonias aisladas durante un período de tiempo.

**Supresión:** la aplicación de medidas fitosanitarias en un área infestada para reducir poblaciones plagas.

**Vigilancia:** un proceso oficial que recopila y registra datos sobre la ocurrencia de ausencia de plagas mediante encuestas, monitoreo u otros procedimientos.

**Monitoreo:** procedimiento oficial realizado durante un período de tiempo definido para determinar las características de una población plaga o para determinar qué especies se encuentran en un área.

**Población objetivo:** población silvestre contra la cual se han liberado las moscas estériles.

**Tratamiento:** Procedimiento oficial autorizado para matar, remover, o dejar infértiles a las plagas.

**Mosca silvestre:** Una mosca que nunca ha sido domesticada o contenida en una colonia de cría.

Términos adicionales pueden ser encontrados en el glosario de términos de TIE ([http://nucleus.iaea.org/ididas/\\_SITGlossary.aspx](http://nucleus.iaea.org/ididas/_SITGlossary.aspx)).

## **Apéndice D: Envíos Transfronterizos de Insectos Estériles**

**Preparado por un Grupo de Consultores de la FAO/AIEA**

**Del 30 de julio al 3 de agosto 2001, Viena, Austria**

### *PREAMBULO*

Se realizó una reunión de consultores para discutir el riesgo potencial de envíos transfronterizos de insectos estériles en los programas de control de plagas. Esta reunión tuvo lugar en Viena en la División Conjunta FAO / OIEA de Técnicas Nucleares para la Alimentación y la Agricultura, del 30 de julio al 3 de agosto de 2001. El grupo de consultores (véase el Anexo 1) se reunió en respuesta a las solicitudes de orientación de las organizaciones nacionales de protección vegetal (ONPF) ante la creciente demanda de alternativas al uso de pesticidas como medida de control exclusiva, y al creciente interés del sector privado para invertir en la Técnica del Insecto Estéril (TIE).

El objetivo de la reunión fue caracterizar el riesgo potencial que representa el envío transfronterizo de insectos estériles enviados para programas TIE y llegar a conclusiones sobre el nivel de riesgo. En el proceso de este análisis, el grupo identificó algunos procedimientos aplicados de manera rutinaria, incluidas las mejores prácticas para el envío que reducen el riesgo a un nivel insignificante. Sin embargo, actualmente no existen pautas reconocidas internacionalmente para regular el envío de insectos estériles.

La guía armonizada respecto a la regulación del envío de insectos estériles facilitará el comercio a la vez que se abordan las preocupaciones sobre el envío de lo que podrían ser plagas cuarentenarias. Este documento fue desarrollado como un artículo de discusión para consideración de la Comisión Interina de Medidas Fitosanitarias (CIMF), el órgano rector de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF).

Un posible resultado de este documento será el desarrollo de una norma internacional que brinde orientación sobre medidas relacionadas con el envío transfronterizo de insectos estériles. Alternativamente, este tema podría agregarse a la Norma Internacional sobre Medidas Fitosanitarias (NIMF) con respecto a los agentes de control biológico (IPPC, 1996) en el momento de su revisión. Sin embargo, ciertas disposiciones en la NIMF sobre agentes de control biológico son inapropiadas cuando se consideran insectos estériles (e.g., en cuarentena para la próxima generación). Además, la definición del Glosario de términos de la CIPF (CIPF, 2001) de control biológico excluye la TIE.

En aras de la armonización, pueden ser necesarios debates similares en la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) con respecto al uso de insectos estériles para el control de enfermedades humanas o animales.

---

## ***RESUMEN EJECUTIVO***

- El uso cada vez mayor de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) para suprimir o erradicar poblaciones de plagas de insectos está dando como resultado un mayor envío de insectos estériles de una plaga objetivo de un país a otro, a menudo pasando en tránsito por otros países. Estos envíos transfronterizos no están sujetos a las normas internacionales de seguridad biológica.
- A medida que la TIE se vuelve más comercial, la necesidad de garantías de que los insectos estériles se puedan enviar de forma segura y legal es esencial para alentar las inversiones financieras en plantas comerciales de cría masiva de insectos estériles. Además, se requieren regulaciones internacionales para reducir la necesidad del desarrollo independiente de regulaciones nacionales que pueden obstaculizar los programas de control de insectos.
- El objetivo de la Reunión de Consultores fue preparar un documento de discusión para consideración de la Comisión Interina de Medidas Fitosanitarias (CIMF), el órgano rector de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF), como un primer paso hacia el desarrollo de una norma internacional u otra orientación sobre el envío transfronterizo de insectos estériles. Es posible que se necesiten discusiones adicionales para abordar los envíos de insectos estériles para el control de plagas de importancia veterinaria y médica.
- El alcance de las discusiones se limitó a los insectos esterilizados por radiación para su uso en los programas de control de la Técnica del Insecto Estéril (TIE) contra las plagas vegetales. Se excluyeron las cepas de insectos producidas artificialmente por ingeniería genética u otros métodos biotecnológicos modernos.
- Se identificaron cuatro peligros potenciales con respecto a los envíos transfronterizos de insectos estériles:
  1. Un brote de la plaga objetivo en un área nueva, donde no había ocurrido antes.
  2. Incremento de la aptitud de la población plaga local por la introducción de material genético por los insectos que se escaparon en un área donde la plaga ya existe.
  3. Acciones regulatorias innecesarias después de una identificación errónea de insectos estériles capturados y la conclusión de que es una amenaza de cuarentena.
  4. Introducción de organismos exóticos contaminantes que no sea la especie objetivo en el programa TIE.
- El envío transfronterizo de insectos estériles ha tenido lugar de manera continua durante casi 50 años. El número total de insectos estériles enviados se estimó en 962 mil millones en más de 12,000 envíos a 22 países receptores de 50 plantas de insectos estériles en 25 países. Durante este largo período no se identificaron problemas asociados con los peligros enumerados anteriormente o cualquier otro, y por lo tanto, el envío de insectos estériles nunca ha sido sometido a ninguna acción reguladora.
- Los riesgos potenciales de los peligros identificados se evaluaron utilizando una técnica de análisis de escenarios.

- Los eventos considerados para el peligro 1 fueron: falla de esterilización, cajas de envío abiertas accidentalmente, escape, sobrevivencia y reproducción de los insectos estériles. Para el peligro 2, además de la secuencia de eventos anterior, los insectos escapados tendrían que reproducirse con una población local y heredar rasgos indeseables a la población. Para el peligro 3, los puntos críticos serían cajas de envío abiertas accidentalmente, escape, sobrevivencia e insectos capturados no reconocidos como estériles. El peligro 4 no es exclusivo de los insectos estériles y, por lo tanto, no se le asignó un riesgo, ya que es posible en envíos de bienes de cualquier tipo.
- Para cada peligro el riesgo estimado fue:
  1.  $0.5 \times 10^{-18}$
  2.  $0.5 \times 10^{-23}$
  3.  $1 \times 10^{-11}$
  4. Muchas veces menos probable que el riesgo de mover agentes de control biológico.
- Los consultores concluyeron que los sistemas actuales de envío transfronterizo de insectos estériles para los programas de TIE son muy seguros. Sin embargo, los reglamentos internacionales deben desarrollarse para aprobación de la Comisión Interina de Medidas Fitosanitarias (CIMF) para facilitar el desarrollo comercial de la TIE.

---

## I. INTRODUCCIÓN

Existe una creciente demanda de control rentable de plagas de insectos de plantas, así como de insectos de importancia veterinaria y médica. Al mismo tiempo, los insecticidas están bajo un mayor escrutinio por posibles impactos toxicológicos y ambientales. Un método alternativo para el control de plagas de insectos es la Técnica del Insecto Estéril (TIE). Esto implica la producción masiva de las especies de insectos objetivo, la esterilización mediante radiación ionizante y la liberación repetida a la población objetivo. La liberación de insectos estériles que se dirigen a una población de la misma especie es una forma de "control de la natalidad". Los insectos estériles se aparean con la población silvestre, pero la fertilización no produce descendencia viable. Las liberaciones repetidas de insectos estériles conducen a una reducción en la población plaga.

La TIE difiere del control biológico clásico que involucra la introducción de agentes de control biológico exóticos, en las siguientes áreas clave:

1. Los insectos estériles no se reproducen por lo que no pueden establecerse en el ambiente.
2. El control autocida es por definición intraespecífico.
3. La TIE se utiliza contra una plaga establecida, nunca introduce una especie exótica en el ecosistema donde se implementa el programa.

La TIE se ha utilizado durante casi 50 años para programas de erradicación, supresión y control de plagas de plantas y animales (e.g., mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata*) y gusano barrenador del Nuevo Mundo (NWS, *Cochliomyia hominivorax*). Debido al número

limitado de plantas para la cría y la esterilización, los insectos estériles a menudo se envían para su liberación en otros lugares. Los envíos transfronterizos han pasado de las plantas de producción a los sitios de liberación en diferentes países. La demanda de la TIE está aumentando y se pueden construir nuevas plantas comerciales para satisfacer esta demanda.

#### *I-A Antecedentes sobre envíos transfronterizos*

Los envíos transfronterizos de insectos estériles se han realizado de forma continua durante los últimos 46 años. El primer envío de NWS estéril fue desde la planta de cría masiva del USDA / APHIS en Florida, EE. UU., a la isla caribeña de Curazao en 1954. Este esfuerzo resultó en la erradicación del NWS de la isla ese mismo año. Esta fue la primera erradicación de una población plaga de insectos utilizando la TIE.

La mayoría de los envíos transfronterizos de insectos estériles se originaron en plantas de producción en Norte y Centro América para su envío a al menos 22 países en 4 continentes, incluidas América, Europa, África y Asia (ver Anexo 3). Un ejemplo es el envío continuo de pupas de mosca del Mediterráneo estériles desde la planta de producción en Tapachula, Chiapas, México, a los centros de empaque y emergencia en el suroeste de Guatemala. Desde 1979, se han realizado envíos quincenales terrestres y aéreos por un total de 280 mil millones de moscas estériles (aproximadamente 4,830 toneladas) en 21 años. Otro caso importante es el envío terrestre y aéreo, desde 1992, de 104 mil millones de NWS estériles (alrededor de 1,733 toneladas) desde la fábrica de gusanos barrenadores en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, a toda América Central, Panamá y el Caribe.

En Europa, la mayoría de los envíos transfronterizos de insectos estériles se han llevado a cabo en apoyo de proyectos piloto de TIE. El primer caso involucró moscas del Mediterráneo estériles enviadas desde el Laboratorio de Agricultura y Biotecnología de la FAO / OIEA en Seibersdorf, Austria, a la isla de Procida, Italia, en 1970. Existen otros ejemplos de envíos transfronterizos de insectos estériles producidos en Europa, como los 206 millones de moscas del Mediterráneo estériles enviadas desde la planta de cría masiva en Madeira, Portugal a Israel durante 1997/98.

Otros casos que involucran a Europa incluyen envíos en tránsito de pupas estériles desde Guatemala, América Central, a través de Amsterdam, Frankfurt o Madrid, a Israel y Sudáfrica, y desde México a través de Frankfurt, a Libia, (ver Apéndice E).

En los últimos 46 años, al menos 962 mil millones de insectos estériles (equivalentes a aproximadamente 18,000 toneladas) se han enviado a nivel internacional. Ninguno de estos envíos ha sido prohibido en tránsito o entrada por razones fitosanitarias por los 22 países receptores o numerosos países en tránsito. Los insectos estériles se envían por carga aérea (líneas aéreas comerciales o aviones charter) o por tierra en camiones refrigerados. Se empaacan en contenedores etiquetados y sellados para evitar la contaminación o el escape. Estas salvaguardas están en su lugar para proteger la integridad de los insectos estériles, la propiedad o el medio ambiente en caso de una fuga. Sin embargo, las mismas medidas sirven como salvaguardas contra los peligros identificados en este documento, lo que reduce en gran medida cualquier riesgo.

#### *I-B Pautas existentes*

Ya existen guías reconocidas internacionalmente sobre muchos procesos en la cría masiva, la esterilización de insectos y el control de calidad (materiales utilizados en la producción, el producto y el proceso) (consulte la Sección IX de Referencias), pero no hay guías internacionalmente reconocidas para regular el envío de insectos estériles. Algunos países no regulan el envío de insectos estériles, otros solo requieren etiquetado y documentación, y aún otros regulan los insectos estériles bajo sus medidas de control biológico. Con el fin de alentar un enfoque armonizado para el tratamiento nacional de este método de control de plagas de vegetales, será muy útil brindar orientación sobre los riesgos involucrados.

## II. ENFOQUE

Este documento de discusión identifica los riesgos involucrados con el envío transfronterizo y la importación (ya sea en tránsito a través de países terceros o directamente al país importador) de insectos estériles para su uso en programas de control autocida de plagas de vegetales. Los peligros de producción masiva *in situ* y los riesgos relacionados con la liberación de insectos estériles no estuvieron incluidos en los términos de referencia de este Grupo de Consultores.

Se consideró el envío de insectos estériles criados en masa, incluidos los desarrollados mediante la selección tradicional y la cría de cepas sexadas. Se excluyeron los insectos estériles resultantes de cepas que pueden crearse mediante ingeniería genética u otros métodos modernos de biotecnología.

Este documento de debate también se limita al envío de insectos estériles resultantes de la esterilidad inducida por la radiación y no se ocupa de los insectos estériles resultantes de la aplicación de otras técnicas de esterilización (por ejemplo, quimiosterilantes o esterilización inducida transgénicamente).

## III. IDENTIFICACIÓN DE PELIGROS

Un objetivo clave del Grupo de Consultores fue identificar y caracterizar los posibles riesgos fitosanitarios asociados con el envío transfronterizo de insectos estériles. Los Consultores identificaron peligros y distinguieron eventos independientes que condujeron a la ocurrencia de cada peligro. Esto proporcionó un formato para estimar la probabilidad y caracterizar las consecuencias de cada peligro en un análisis de escenarios. La **Figura 1** muestra los escenarios para cada uno de los peligros.

Cuatro peligros potenciales fueron identificados:

PELIGRO	EVENTO PRIMARIO QUE PODRÍA RESULTAR EN ESTE PELIGRO
1. Brote de una plaga objetivo en una nueva área	Falla en la esterilización
2. Incremento de la aptitud de la población plaga local	Falla en la esterilización
3. Acción reguladora innecesaria iniciada	Falla en la ID del insecto estéril
4. Introducción de organismos contaminantes exóticos (nuevos)	Presencia amplia en diferentes tipos de envíos

Los dos primeros escenarios requieren el fracaso del tratamiento de esterilización como primer evento. Esto podría significar una falla absoluta (es decir, el envío no fue irradiado) o que el tratamiento fue inferior al necesario para cumplir con las especificaciones requeridas para la esterilidad.

El segundo evento que debe ocurrir en los dos primeros escenarios es un rompimiento del paquete para permitir el escape del material biológico. Se supone que en la mayoría de los casos esto será bajo condiciones adversas (e.g., el entorno de manejo de carga del aeropuerto). Como resultado, la plaga no solo debe liberarse (evento c), sino que también debe sobrevivir, llegar a un ambiente favorable (evento d). Finalmente, debe aparearse y reproducirse para que ocurra el peligro 1 o 2. Sin embargo, en el caso del peligro 2, en el escenario se reconoce que la introducción de nuevo material genético en sí mismo no presenta un riesgo, a menos que se exprese un rasgo genético indeseable y que éste tenga una ventaja selectiva para establecerse en la población (evento e).

La situación en el peligro 3 no está relacionada con las consecuencias biológicas, sino en acciones reguladoras (e.g., delimitación del muestreo) que puede ser innecesario porque el país donde se detecta el insecto escapado no se reconoce como estéril. Los socios comerciales pueden adoptar medidas fitosanitarias adversas basadas en el reportes porque no se distingue este insecto como estéril.

El peligro 4, la introducción de organismos contaminantes exóticos, no se caracterizó igual que los otros tres riesgos porque es un conjunto de subescenarios que dependen de la naturaleza de los organismos contaminantes (i.e., parasitoides, virus, etc.). Este peligro también es diferente porque no es exclusivo de los insectos estériles. Existen riesgos similares con el envío de agentes de control biológico y, en cierta medida, con cualquier envío. De hecho, el proceso de cría de insectos estériles prácticamente elimina cualquier parasitoide.

En cada uno de los tres escenarios (riesgos 1, 2 y 3) donde se identificaron eventos independientes, la probabilidad de que ocurra cada evento está representada por estimaciones aproximadas de la probabilidad (una estimación puntual). El producto de las estimaciones para eventos independientes en cada escenario proporciona una estimación general de la probabilidad de que ocurra el peligro. Se puede notar que la relación matemática de estos eventos significa que donde cualquier evento en un escenario es cero, la probabilidad para todo el escenario también es cero.

Las estimaciones se basan en datos, registros anteriores del programa y experiencia y opinión de expertos, principalmente en lo que respecta a moscas de la fruta y algunas especies de lepidópteros. Implican eventos extremadamente raros para los cuales la principal fuente de evidencia es la historia sustancial de la experiencia con los envíos TIE desde 1954, y el conocimiento detallado de los aspectos técnicos / científicos de la tecnología.

Este enfoque se utilizó para permitir la comparación de los niveles de riesgo entre eventos y peligros asociados con el envío transfronterizo de insectos estériles. No pretendía ser cuantitativamente preciso, sino más bien aclarar las diferencias relativas en magnitud. También es útil para facilitar la comparación de los riesgos fitosanitarios asociados con el envío transfronterizo de insectos estériles con los asociados con otros envíos transfronterizos (i.e., agentes de control biológico). El proceso de análisis de escenarios se limita a caracterizar



los riesgos fitosanitarios directos asociados con el rango de plagas insectiles de vegetales controladas histórica y actualmente por la TIE para aplicaciones fitosanitarias. Cabe señalar que los escenarios son útiles para el manejo del riesgo de plagas en la medida en que ayudan a distinguir los puntos de control donde se pueden aplicar medidas de reducción de riesgos. Este proceso no considera los riesgos indirectos ni evalúa los riesgos contra los beneficios (e.g., un mayor uso de pesticidas sin TIE). En particular, debe reconocerse que aunque el nivel de riesgo para cualquier peligro particular puede ser el mismo para un país importador y de tránsito, el país de tránsito no se beneficia en el mismo grado que el país importador al aceptar este riesgo. En cualquier caso, las medidas de los países importadores o de tránsito deben estar técnicamente justificadas en un análisis de riesgos o en una norma internacional.

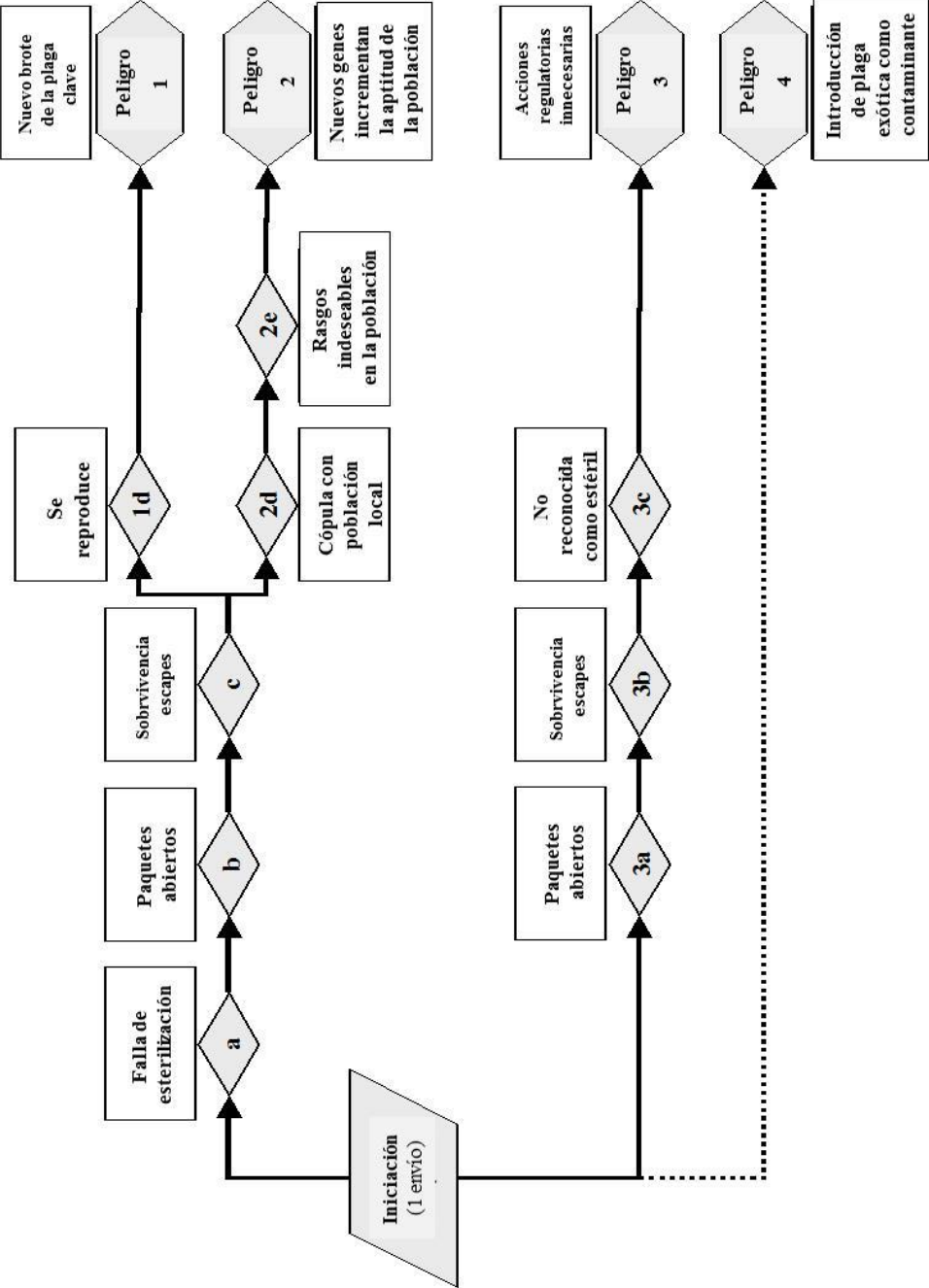


Figura 1. Escenarios de peligro para el envío transfronterizo de insectos estériles.

## IV. PROBABILIDAD DEL EVENTO

### *V-A Peligro 1: Brote del insecto plaga objetivo en un área nueva*

#### **Evento a: Falla en esterilización**

Se han realizado aproximadamente 12,000 envíos terrestres y aéreos de insectos estériles desde 1954 y se han reportado dos casos de fallas parciales en la esterilización (1 confirmado y 1 no confirmado). El incidente confirmado ocurrió en 1982 en un envío de moscas de Costa Rica a Guatemala (S. Sanchez, comunicación personal, 1982) y el incidente no confirmado con un envío de moscas de Perú a California, EE. UU., en 1980 (Rohwer, 1987). Desde entonces se establecieron estándares internacionales de control de calidad y no ha habido fallas de esterilización a pesar del aumento significativo en el uso de la TIE.

Garantías actuales para evitar fallas de esterilización:

- Las plantas modernas de producción emplean sistemas de irradiación a prueba de fallas (i.e., físicos y / o de procedimiento) para evitar esto.
- Cada contenedor tratado tiene un dispositivo de dosimetría que asegura que éste fue irradiado.
- La dosis mínima recibida por todos los insectos excede por mucho la dosis requerida para esterilizar a las hembras.
- Los irradiadores están equipados con configuraciones de exposición automática a prueba de manipulaciones.
- Se cumplen procedimientos para la calibración de rutina del equipo.
- Los paquetes están claramente etiquetados que contienen insectos estériles.
- Una muestra de insectos de cada envío se somete a bioensayos para determinar la esterilidad en planta y en el sitio de liberación para el control de calidad.

*La probabilidad estimada por los consultores resultó en un evento extremadamente raro con una probabilidad de  $0.5 \times 10^{-6}$*

#### **Evento b: Paquetes abiertos**

Además del evento anterior, sería poco probable que los paquetes que transportan los insectos fértiles se abran porque:

- En decenas de miles de contenedores enviados desde 1954 no se ha documentado ningún caso de rotura del paquete.
- Utilizando una de las rutas más largas (i.e., Ciudad de Guatemala-Miami-Frankfurt-Tel Aviv) desde 1998 hasta 2001, 1 envío de 400 nunca se recuperó. En este caso, debido al período de tiempo involucrado, el material altamente perecedero, es decir los insectos estériles, no sobreviviría.
- Las salvaguardas actuales para evitar el mal manejo que conduce a la rotura del paquete incluyen:
  - Todos los envíos son de doble empaque, algunos de triple empaque y después sellados.

- Los envíos son rastreados de cerca con motivación comercial para el tránsito rápido de material altamente perecedero.
- Retroalimentación rápida del receptor cuando el paquete se retrasa.
- Tamaño y peso del paquete diseñado para minimizar una rotura.
- Todos los paquetes están debidamente etiquetados (e.g., material biológico frágil) y numerados.
- El contenido del paquete no atrae el robo.

*El grupo consultor estimó que la probabilidad era un evento extremadamente raro con una probabilidad estimada de  $1 \times 10^{-5}$*

### **Evento c: Sobrevivientes/escape**

Además de los eventos anteriores, es poco probable que los insectos fértiles sobrevivan y se dispersen en un hábitat favorable porque:

- El área de tránsito inmediata es inhóspita (i.e., falta de agua, alimentos, temperatura inadecuada, sin hospederos, sustrato de concreto/asfalto), presencia de insecticidas en los aeropuertos.
- La seguridad del aeropuerto evita la extracción no autorizada de paquetes del aeropuerto.
- Supervivencia limitada desde pupa a adulto, con una menor posibilidad de sobrevivir hasta la madurez sexual y dispersarse, a causa de una mayor depredación, desecación, inanición, ahogamiento, estrés por temperatura, etc.

*El grupo consultor estimó que la probabilidad era un evento bastante improbable con una probabilidad estimada de  $1 \times 10^{-3}$*

### **Evento d: Reproducción**

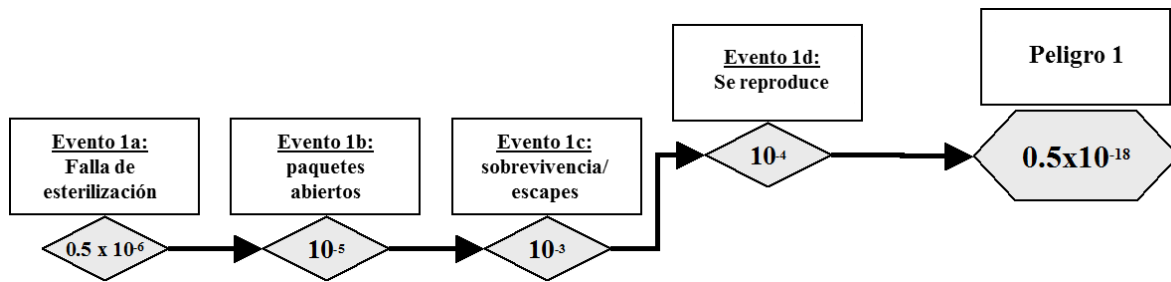
Además de los eventos anteriores, la reproducción de los insectos escapados sería poco probable porque:

- El evento puede ocurrir durante un período estacional inhóspito.
- Factores climáticos no aptos para el establecimiento.
- La cepa de fábrica tiene menor aptitud para sobrevivir en la naturaleza.
- Muy pocos sobrevivientes para dispersarse y encontrar un ambiente adecuado, conoespecíficos para la cópula y hospederos.

*El grupo consultor estimó que la probabilidad era un evento raro con una probabilidad estimada de  $1 \times 10^{-4}$*

*Para el escenario del peligro 1, la probabilidad de que ocurrieran los cuatro eventos se estimó como un riesgo insignificante con una probabilidad de  $0.5 \times 10^{-18}$*

## Resumen del peligro 1: brote del insecto plaga objetivo en una nueva área



### IV-B Peligro 2: aumento de la aptitud de la población local de la plaga mediante la introducción de material genético de los insectos escapados

Para que este escenario tenga lugar, los eventos 2a, 2b y 2c deben ocurrir. Estos tienen los mismos valores que 1a, 1b y 1c. Los eventos d y e también deben ocurrir:

#### **Evento d: Los Insectos escapados alcanzan la madurez sexual y copulan con la población local**

Además de los eventos anteriores, es poco probable que los insectos que escaparon alcancen la madurez y el apareamiento. Este evento es muy similar al 1d, pero supone que existe una población de la plaga establecida en el área y que las hembras y machos silvestres son receptivos al apareamiento.

*El grupo de consultores estimó que la probabilidad era un evento bastante improbable, con una probabilidad estimada de  $1 \times 10^{-3}$ .*

#### **Evento e: Rasgos indeseables establecidos en la población**

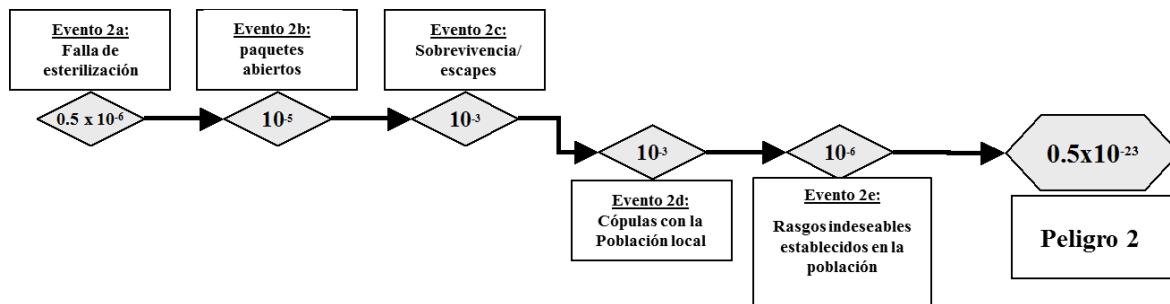
Además de los eventos anteriores, los insectos escapados tendrían que poseer rasgos que transmitan una ventaja selectiva que conduzcan a una mayor aptitud. Además, estos rasgos tendrían que establecerse en la población. Sin embargo, esto es extremadamente improbable porque:

- La mayoría de las introducciones de material genético tienen un efecto neutral o incluso perjudicial en la población. Además, debido al pequeño número de insectos escapados, es poco probable que estos rasgos se establezcan en la población silvestre.
- En condiciones de cría masiva durante muchas generaciones, se sabe que las cepas de laboratorio pierden su aptitud para sobrevivir en condiciones naturales, por lo tanto, es muy poco probable que tengan rasgos genéticos que aumenten la aptitud de la población silvestre.
- Además, los únicos rasgos conocidos que se han introducido en cepas de cría masiva a través de la selección tradicional y el mejoramiento por mutación (i.e., marcadores y características de sexado) son perjudiciales (e.g., genes letales sensibles a la temperatura).

*El grupo de consultores estimó que la probabilidad era un evento extremadamente raro con una probabilidad estimada de  $1 \times 10^{-6}$ .*

*Para el escenario 2, la probabilidad de que ocurran los cinco eventos se estimó como un riesgo insignificante de  $0.5 \times 10^{-23}$*

**Resumen del peligro 2:** Aumento de la aptitud de la población plaga local mediante la introducción de material genético de los insectos escapados.



*IV-C Peligro 3: Acciones regulatorias innecesarias que se iniciaron por la falta de reconocer que el insecto detectado era estéril*

Evento 3a (i.e., paquetes abiertos) es idéntico al evento 1b. El evento 3b (i.e., sobrevive y escapa) es el mismo que el evento 1c.

### **Evento c: No reconocido como estéril**

Además de los eventos anteriores, los insectos escapados tendrían que ser detectados y no reconocidos como estériles.

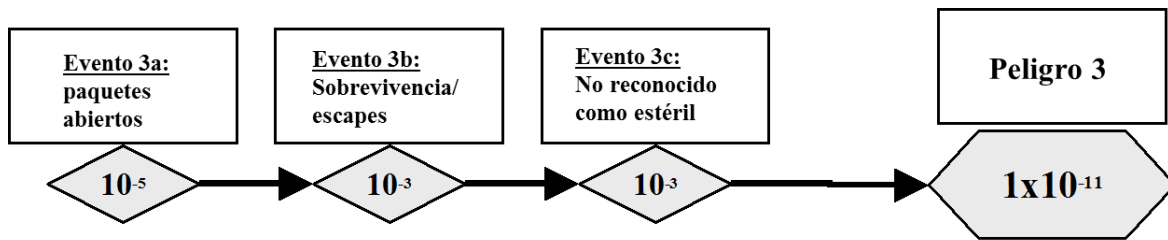
Para que esto ocurra, el insecto debe ser de importancia regulatoria:

- Las autoridades de protección de plantas tendrían que realizar encuestas de detección.
- Las autoridades de protección vegetal tendrían que fallar en reconocer que es un insecto estéril, lo cual es un evento poco probable. Los países con más probabilidades de tomar una acción reguladora tienen procedimientos operativos estándar que reconocen la posibilidad de capturar insectos estériles.
- El proceso de marcado de insectos estériles y la identificación citológica de esterilidad tendrían que fallar.

*El grupo consultor estimó que la probabilidad era un evento bastante improbable con una probabilidad estimada de  $1 \times 10^{-3}$ .*

*Para el escenario 3, la probabilidad de que ocurran los tres eventos se estimó como un riesgo insignificante de  $1 \times 10^{-11}$ .*

### Resumen del peligro 3: Acciones regulatorias innecesarias que se iniciaron por la falta de reconocimiento del insecto detectado como estéril



#### IV-D Peligro 4: Introducción de organismos contaminantes exóticos (nuevos)

La introducción de organismos contaminantes exóticos se caracterizó de manera diferente debido a la complejidad de los subescenarios involucrados dependiendo de la naturaleza de los organismos contaminantes (e.g., parasitoides versus microorganismos). Este peligro también es diferente porque no es exclusivo de los insectos estériles. Existen riesgos similares con el envío de agentes de control biológico y, en cierta medida, con cualquier envío. Por lo tanto, se comparó con los riesgos del envío de agentes de control biológico que se practica ampliamente.

Se estimó que el riesgo de envíos de insectos estériles que introducen organismos exóticos es considerablemente menor con base en las siguientes consideraciones:

- No hay evidencia documentada de que tal evento haya ocurrido durante los últimos 46 años de envío de insectos estériles.
- Los artículos que se envían se someten a esterilización. Esto reduciría efectivamente el riesgo de introducir parásitos no deseados.
- Los organismos recolectados en la naturaleza nunca se envían con fines de TIE. El producto se cría en masa durante muchas generaciones bajo procedimientos de control de calidad destinados a eliminar organismos no deseados.
- Los procedimientos operativos estándar para la cría masiva de insectos proporcionan específicamente mecanismos para prevenir organismos no deseados.

*Para el escenario 4, los consultores estimaron que este riesgo sería muchas veces menos probable que el riesgo de introducir organismos exóticos involucrados al mover agentes de control biológico.*

### V. CONSECUENCIAS EN CASO DE QUE OCURRIERAN LOS PELIGROS IDENTIFICADOS

Suponiendo que se produjeron los peligros identificados, el grupo de expertos describió las siguientes posibles consecuencias:

#### **Peligro 1: Brote de la plaga de insecto objetivo en un área nueva**

La consecuencia de este peligro es la incursión o el establecimiento de una plaga insectil grave. El impacto negativo de la nueva plaga podría incluir:

- Decremento en la producción de cultivos.
- Reducción en la calidad.

- Incremento en los costos de producción.
- Impacto en el comercio.
- Impacto en el ambiente.

Estas consecuencias se aplican tanto a las incursiones como al establecimiento. En el caso de incursiones, el impacto negativo sería limitado en alcance y duración. Esto se debe a que para una incursión las condiciones no serían adecuadas para el establecimiento permanente de la plaga (e.g., la plaga no puede sobrevivir a las temperaturas de invierno o verano). Sin embargo, en caso del establecimiento de la plaga, la erradicación sería una opción ya que la TIE y otras herramientas de erradicación están disponibles para las especies que actualmente se envían como insectos estériles.

### **Peligro 2: Aumento de la aptitud de la población local de la plaga mediante la introducción de material genético de los insectos escapados**

Las consecuencias negativas de la población plaga local existente aumentarían como resultado de la introducción de nuevo material genético. Este impacto podría ser:

- Disminución de la producción en cultivos ya afectados.
- Pérdidas en otras especies de cultivos.
- Impacto ambiental.
- Impacto en el comercio.

Con la existencia de una población local, sin embargo, las prácticas de control pueden manejar eficazmente la plaga en forma correcta. Esto puede reducir las consecuencias.

### **Peligro 3: Acciones regulatorias innecesarias que se inician por no reconocer al insecto detectado como estéril**

Esto se aplicaría solo a plagas sometidas a un programa de vigilancia activa. La detección y la imposibilidad de reconocer al insecto como estéril podría desencadenar varias acciones diferentes:

- Un aumento en el trapeo (i.e., delimitación de la captura) para evaluar el estado de la detección.
- El inicio de un programa de emergencia para la erradicación.
- Interrupción de movimientos internos y comercialización por acciones regulatorias nacionales.
- Prohibición del producto hospedero por un socio comercial.

La implementación de estas acciones podría tener importantes implicaciones financieras a corto plazo.

### **Peligro 4: Introducción de organismos contaminantes exóticos (nuevos)**

La introducción de un organismo exótico en un nuevo ecosistema puede tener los siguientes impactos negativos:

- Los daños directos en los cultivos agrícolas si el organismo introducido es una plaga vegetal exótica.

- Daño indirecto en los cultivos agrícolas si el organismo introducido tiene un impacto negativo en los organismos benéficos (polinizadores, depredadores y parasitoides).
- Cambio en la biodiversidad y el ecosistema natural.

Este peligro no es exclusivo del envío de insectos estériles y, por lo tanto, debe considerarse en comparación o en el contexto del mismo peligro asociado con los envíos de otros productos, incluidos los envíos no biológicos.

## **VI. RIESGO EVALUADO**

El riesgo es el producto de la probabilidad del peligro multiplicado por las consecuencias. Las posibles consecuencias de los peligros identificados podrían ser significativas. Sin embargo, la probabilidad extremadamente baja de que ocurran los peligros indica un riesgo general insignificante.

## **VII. CONCLUSIONES**

Los Consultores mantuvieron discusiones detalladas y revisaron documentos de referencia teniendo en cuenta los aspectos científicos, técnicos y operativos de la Técnica de Insectos Estériles (TIE) aplicada a la protección vegetal. Se identificaron peligros biológicos potenciales y riesgos asociados para el envío transfronterizo de insectos estériles para su uso en programas TIE.

Los consultores concluyeron lo siguiente:

- A.** La evidencia indica que es probable que la TIE sea más utilizada en el futuro. También hay un cambio desde los gobiernos a la responsabilidad privada en ciertos aspectos de la tecnología. Esto requerirá un enfoque más formal de las actividades que involucran a más de un país, y es particularmente relevante para la producción que resulta en envíos transfronterizos de los insectos estériles.
- B.** La TIE se ha utilizado durante casi 50 años contra las plagas de insectos de plantas y animales. Durante este tiempo, la mayoría de los programas han desarrollado procedimientos operativos estándar. En algunos casos, los estándares internacionales se han desarrollado y están en uso en todo el mundo. Para las especies de moscas de la fruta, los más importantes son los manuales de control de calidad y dosimetría<sup>1</sup> (FAO / OIEA / USDA, 1998 y FAO / OIEA, 2000). La aplicación adecuada de estos manuales impide que ocurran los peligros identificados por el Grupo de Consultores.
- C.** Existe la necesidad de un código de conducta internacionalmente aceptado (o documento similar) relacionado con los envíos transfronterizos de insectos estériles para su uso en programas de TIE. La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es el organismo internacional de establecimiento de normas para medidas fitosanitarias. Dado que la TIE también se usa contra las plagas de insectos de importancia médica y veterinaria, las plagas de insectos de ganado y los vectores de insectos de importancia médica deben ser considerados por los organismos apropiados en un futuro cercano.
- D.** El Grupo de Consultores identificó los peligros y evaluó los riesgos asociados con el envío transfronterizo de insectos estériles para los programas de TIE. Se consideraron tanto la probabilidad como las consecuencias para cada uno de los peligros



identificados. Se requeriría una serie de eventos secuenciales para que ocurra cualquiera de estos peligros potenciales. Ninguno de los eventos por sí solo constituiría un peligro (ver **Figura 1**).

**E.** Los peligros identificados, consecuencias potenciales y probabilidad de que los peligros ocurran fueron:

1. Fracaso de la esterilización, ya sea total o parcial, resultando en que el insecto objetivo se convierta en una plaga establecida en una nueva área, con la probabilidad de  $0.5 \times 10^{-18}$ .
2. Introducción de nuevo material genético (intraespecífico) por los "insectos estériles" en una población de la plaga establecida que resulte en una plaga de insectos más dañina, con la probabilidad de  $0.5 \times 10^{-23}$ .
3. Falla en reconocer un insecto detectado como estéril, lo que resulta en una acción reguladora innecesaria y quizás costosa, con la probabilidad de  $1 \times 10^{-11}$ .
4. Se estimó que la introducción de un organismo contaminante exótico, que de como resultado el establecimiento de una nueva plaga, implica un riesgo mucho mayor que el del movimiento de agentes de control biológico, un riesgo ya ampliamente aceptado.

**F.** Debido a la secuencia de eventos necesarios para que ocurra cualquiera de los peligros anteriores, el Grupo de Consultores concluyó que el envío transfronterizo daría lugar a un riesgo insignificante con el uso de los procedimientos operativos de la FAO / OIEA con respecto a la esterilización, manipulación / embalaje y envío de insectos estériles.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

El Grupo de Consultores recomienda que este documento se envíe a la Secretaría de la CIPF para su consideración por la CIMF como base para una norma. El Grupo también recomienda que esta norma se separe de la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias número 3 sobre agentes de control biológico standard.

Además, los consultores recomiendan que los organismos internacionales apropiados evalúen los riesgos del envío transfronterizo de insectos plaga e insectos de importancia médica controlados a través de TIE, y desarrollen una guía armonizada.

## **IX. REFERENCIAS**

### *Guías relevantes para la TIE*

**American Society for Testing and Materials (ASTM)** (1999), Standard Guide for Irradiation of Insects for Sterile Release Programs. Designation: ASTM E 1940 - 98. 11 pp.

**FAO/IAEA** (2000) Gafchromic® Dosimetry System for SIT, Standard Operating Procedure. Joint FAO/IAEA, Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Vienna, Austria, 42 pp.

**FAO, IAEA and United States Department of Agriculture (USDA)** (1998) Product Quality Control, Irradiation and Shipping Procedures for Mass-Reared Tephritid Fruit Flies for Sterile Insect Release Programs. Recommendations reached by consensus by an international group of fruit fly quality control experts. 52 pp.

### *Other references*

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)** (1992) The new world screwworm eradication programme-North Africa 1988-1992. 192 pp.
- International Plant Protection Convention (IPPC)** (1996) Code of conduct for the import and release of exotic biological control agents. ISPM Pub. No. 3. FAO, Rome.
- IPPC** (1997) New revised text approved by the FAO conference at its 29<sup>th</sup> Session- November 1997. FAO, Rome.
- IPPC** (1998a) Guidelines for surveillance. ISPM Pub. No. 6, FAO, Rome.
- IPPC** (1998b) Determination of pest status in an area. ISPM Pub. No. 8, FAO, Rome.
- IPPC** (1998c) Guidelines for pest eradication programs. ISPM Pub. No. 9, FAO, Rome.
- IPPC** (2001a) Glossary of Phytosanitary Terms. ISPM Pub. No.5, FAO, Rome.
- IPPC** (2001b) Pest risk analysis for quarantine pests. ISPM Pub. No. 11, FAO, Rome.
- Miller L., M. D. McElvaine, R. M. McDowewell and A. S. Ahl** (1993) Developing a quantitative risk assessment process, Rev. sci. tech. int. epiz.,1993,V12(4), 1153-1164
- Nagel, P.** (1995) Environmental monitoring handbook for tsetse control operations. The scientific environmental monitoring group (SEMG) (ed.) Weikersheim: Markgraf 323 pp.
- Orr, Richard L., Susan D. Cohen and Robert L. Griffin** (1993) Generic Non-indigenous pest risk assessment process, “the generic process” (for estimating pest risk associated with the introduction of non-indigenous organisms). USDA/APHIS Policy and Program Development publication. 40 pages.
- Rohwer, G. Gregor** (1987) An Analysis of the Mediterranean Fruit Fly Eradication Program in California, 1980-82. USDA/APHIS/PPQ publication. 20 pages.
- United States Department of Agriculture (USDA)/Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)** (1991) Guatemala MOSCAMED Program. Environmental Analysis. 71 pages.
- USDA/APHIS** (1992) Risk Assessment: Mediterranean fruit fly. 113 pages.
- USDA/APHIS** (1993) The economic impact assessment of the Mediterranean fruit fly cooperative eradication program. 27 pages.
- USDA/APHIS** (1993) Medfly Cooperative Eradication Program. Final Environmental Impact Statement. 184 pages.
- USDA/APHIS** (1998) Medfly Cooperative Eradication Program, Central Florida, Environmental Assessment. 6 pages.
- USDA/APHIS** (1998) Medfly Cooperative Eradication Program, Southern Florida, Environmental Assessment. 12 pages.
- USDA/APHIS** (1999) Medfly Cooperative Eradication Program, Lake Forest California, Environmental Assessment. 12 pages.
- USDA/APHIS** (1999) Fruit Fly Cooperative Control Program. Draft Environmental Impact Statement. 356 pages.

## Apéndice E: Historia de Envíos Transfronterizos de Moscas de la Fruta Tefritidas (1963-2015)

Año	Especie de tefritido	Sitio de producción	Cantidad enviada (millón de pupas)	Receptor	Observaciones
1963-1990	Mosca Mexicana de la fruta <i>Anastrepha ludens</i>	Monterrey, Mexico	Desconocido	Texas, USA	Cantidades pequeñas ya que las moscas se usaron en ensayos de campo
1970/71	Mosca del Mediterráneo <i>Ceratitis capitata</i>	Seibersdorf, Austria	Desconocido	Procida, Italia, y Grecia	Cantidades pequeñas ya que las moscas se usaron en ensayos de campo
1970	Mosca del Mediterráneo	Costa Rica	Desconocido	Nicaragua	Cantidades pequeñas ya que las moscas se usaron en ensayos de campo
1975-1977	Mosca del Mediterráneo	Madrid, España	302	Islas Canarias	Cantidades pequeñas ya que las moscas se usaron en ensayos de campo
1978	Mosca del Mediterráneo	Seibersdorf, Austria	Desconocido	Guatemala	Pupa estéril de Seibersdorf hacia un centro de empaque y emergencia en Guatemala para ensayos de campo y entrenamiento del staff en la TIE
1979-2000	Mosca del Mediterráneo	Chiapas, Mexico	280,000	Guatemala	Dos veces por semana envíos transfronterizos se realizaron durante 21 años
1989-1994	Mosca del Mediterráneo	Chiapas, Mexico	6,670	California, USA	Apoyo al CDFA en la erradicación de brotes de la mosca del Mediterráneo

<b>Año</b>	<b>Especie de tefrítido</b>	<b>Sitio de producción</b>	<b>Cantidad enviada (millón de pupas)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Observaciones</b>
1990	Mosca del Mediterráneo	Chiapas, Mexico	552	Chile	Moscas estériles donadas por el gobierno Mexicano al proyecto de erradicación en Arica, Chile
1992-1993	Mosca del Mediterráneo	Mission, Texas	3500	Estado de Baja California Norte, Baja California Sur, y Sonora, Mexico	Programa de Erradicación
1994-1996	Mosca Mexicana de la fruta	Tapachula, Chiapas, Mexico	11000	Estado de Baja California Norte, Sonora, Coahuila y Sinaloa México	Programa de Erradicación
1997-2000	Mosca de las Indias occidentales <i>A. obliqua</i>	Tapachula, Chiapas, Mexico	3900	Estado de Sinaloa y Tamaulipas	Programa de Erradicación
1989-1990	Mosca del Mediterráneo	Seibersdorf, Austria	Desconocido	Israel	Ensayos piloto
1994	Mosca del Mediterráneo	Seibersdorf, Austria	60	Tunes	Ensayos piloto
1996-2000	Mosca del Mediterráneo	Chiapas, Mexico	2,511	California, USA	Suprimir/Eliminar Brotes de la mosca Mexicana de la fruta
1994-2001	Mosca del Mediterráneo	El Pino, Guatemala	51,800	California, USA	Apoyo al CDFA en la erradicación de brotes de la mosca del Mediterráneo
1997/98	Mosca del Mediterráneo	Madeira, Portugal	206	Israel	En apoyo al programa piloto de supresión
1997-2000	Mosca del Mediterráneo	El Pino, Guatemala	1,000	Israel	En apoyo al programa piloto de supresión
1998-2001	Mosca del Mediterráneo	El Pino, Guatemala	19,500	Florida, USA	En apoyo al estado de Florida en la erradicación de brotes de la mosca del Mediterráneo

<b>Año</b>	<b>Especie de tefrítido</b>	<b>Sitio de producción</b>	<b>Cantidad enviada (millón de pupas)</b>	<b>Receptor</b>	<b>Observaciones</b>
1999-2000	Mosca del Mediterráneo	El Pino, Guatemala	600	Sudáfrica	En apoyo del programa piloto de supresión
2007-2013	Mosca del Mediterráneo	Bio-Fly, Israel	504	Jordania	En apoyo del programa piloto de supresión
2009-2011	Mosca del Mediterráneo	Madeira, Portugal	696	Marruecos	En apoyo del programa piloto de supresión
2010, 2012, y 2014	Mosca del Mediterráneo	Bio-Fly, Israel	969	Croacia	En apoyo del programa piloto de supresión
2011 y 2013	Mosca del Mediterráneo	Valencia, España	425	Croacia	En apoyo del programa piloto de supresión