

GLANDULAS SALIVALES DE *ANASTREPHA OBLIQUA* (MACQUART) (DIPTERA: TEPHRITIDAE): ANALISIS QUIMICO Y MORFOLOGICO, Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS COMPONENTES VOLATILES

ARACELI IBANÉZ-LÓPEZ Y LEOPOLDO CRUZ-LÓPEZ

El Colegio de la Frontera Sur, Km 2.5 carretera Antiguo Aeropuerto. Apartado Postal 36, 30700
Tapachula, Chiapas, MEXICO.

RESUMEN. En este estudio se determinó la edad y hora del día de mayor actividad sexual de *Anastrepha obliqua* (Diptera:Tephritidae). Simultáneamente, se identificaron los componentes volátiles producidos en las glándulas salivales y se comparó con los volátiles emitidos por machos de *A. obliqua* en el periodo de llamado. Se evaluó la respuesta de hembras vírgenes de *A. obliqua* a extractos de glándulas salivales de machos. Los resultados muestran que el mayor número de apareamiento en edades se presentó de 7 a 11 días. Se observó que la hora donde se presentó un mayor número de apareamientos fue de 7.00 a 9.00 h. El análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG-EM) muestran que glándulas contienen (*E,E*)- α -farneseno y (*E,Z*)- α -farneseno los cuales son dos de los compuestos emitidos por los machos en el periodo de llamado. Las hembras respondieron positivamente a los extractos de glándulas salivales.

PALABRAS CLAVE: *Anastrepha obliqua*, mosca de fruta, glándula salival, feromona sexual.

ABSTRACT. In this research the age and time of day of higher sexual activity was determined for *Anastrepha obliqua* (Diptera:Tephritidae). Simultaneously, the volatiles produced in the salivary glands were identified and compared with those released from calling males. The response of virgin females of *A. obliqua* to the male salivary glands extracts was evaluated. The results obtained showed that the optimal age for higher sexual activity was 7 to 11 days of age, the optimal day time was 7.00-9.00 h. The Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of the volatiles from males salivary glands showed two compounds (*E,E*)- α -farnesene and (*E,Z*)- α -farnesene which are two of the volatile compounds released from males during calling. The response of virgin females to salivary gland extract was positive.

KEY WORDS: *Anastrepha obliqua*, fruit fly, salivary gland, sex pheromone.

La mosca de las Indias Occidentales, *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) es la plaga mas importante del cultivo del mango (*Mangifera indica*) en México y en otros países productores de América Latina (Hernández-Ortiz 1992; Aluja *et al.* 1996).

El comportamiento sexual de varias especies de *Anastrepha* presenta un patrón muy similar. Los machos toman una postura característica, presentando unas protuberancias en la porción lateral abdominal, así como también la proyección anal hacia el exterior con un movimiento vigoroso de las alas, en conjunto, son un

indicador de la liberación de la feromona sexual para atraer a las hembras (Nation 1972; Perdomo 1974; Dodson 1978; Burk 1983; Morgante *et al.* 1983; Malavasi *et al.* 1983; Robacker y Hart 1985a).

Se han realizado estudios en la identificación química de los componentes volátiles de la feromona sexual en algunas especies del género *Anastrepha*. En *A. ludens* se han identificado ocho compuestos en extractos o volátiles capturados de machos: (Z)-nonenol; (Z,Z)-3,6-nonadienol (Nation 1983), anastrefina (*E*-hexahidro-*E*-4-7a-dimetil-4-vinil-2-[3H]-benzofuranona), epianastrefina (*E*-hexahidro-Z-4,7a-dimetil-2-[3H]-benzofuranona) (Battiste *et al.* 1983), suspensolide (*E,E*, 4,8-dimetil-3,8-decadien-10-olide) (Chuman *et al.* 1988), β -bisaboleno, ocimeno y (*E,E*)- α -farneseno (Rocca *et al.* 1992). Los volátiles producidos o emitidos por *A. suspensa* son similares en estructura de los producidos por *A. ludens*: (Z)-3-nonenol, (Z,Z)-3,6-nonadienol, (*S,S*)-(-)-epianastrefina (Esponda-Gaxiola 1977; Battiste *et al.* 1983; Nation 1983; Stokes *et al.* 1983). Rocca *et al.* (1992) reportaron que tanto *A. suspensa* y *A. ludens* liberan los mismos tres sesquiterpenos hidrocarbonados, (*E,E*)- α -farneseno, β -bisaboleno, y α -trans-bergamoteno pero en diferentes proporciones. Además, establecieron la configuración absoluta del β -bisaboleno como el (*R*)- (+)-enantiómero, aislado en suficiente cantidad a partir de volátiles de *A. suspensa*; así también, reportaron que ésta especie produce el monoterpeno (Z)- β -ocimeno, mientras que *A. ludens* contenía en los volátiles el monoterpeno limoneno. Estudios con glándulas aisladas y análisis de tejidos en machos de *A. fraterculus* mostraron que los compuestos químicos para el llamado, que liberan los machos en ésta especie son producidos o almacenadas en las glándulas salivales. Los compuestos identificados fueron (*E,E*)- α -farneseno (*Z,E*)- α -farneseno, (*E,Z*)- α -farneseno y (*E,E*)-suspensolide (De lima *et al.* 1994). Así también, revelaron la presencia de pirazinas: 2,5-dimetilpirazina, 2,3,5-dimetilpirazina y 3-etil-2,5-dimetilpirazina. Recientemente Heath *et al.* (2000) reportó que machos de *A. obliqua* producen (*Z,E*)- α -farneseno, (*E,E*)- α -farneseno y (Z)-3-Nonenol.

La biosíntesis de los diferentes componentes feromonales en algunas especies del género *Anastrepha* tienen lugar en estructuras complejas de células que conforman dos glándulas específicas que se encuentran en los machos, siendo éstas la glándula pleural, que consiste en un conjunto de células epidérmicas alargadas en forma de columna y la glándula salival dimórfica (Nation 1974, 1981). Las glándulas salivales de algunas especies de *Anastrepha*, incluyendo *A. obliqua*, se forma de un ducto común en la cabeza la cual se bifurca en dos tubos laterales, los cuales se extienden en cada lado del abdomen y terminan como grandes aglomeraciones tubulares (Nation 1981). Estudios realizados con la estructura rectal de machos de siete especies de *Anastrepha*, incluyendo *obliqua*, suponen que una de las funciones de los pliegues epiteliales del recto es la secreción de la feromona sexual (Barros y Malavasi 1996).

El objetivo de este trabajo fue determinar la edad óptima de mayor actividad sexual de *A. obliqua*, aislar e identificar químicamente el/los componentes volátiles producidos en las glándulas salivales de machos de *A. obliqua* y compararlos con los volátiles emitidos por machos en el periodo de llamado. También se evaluó la respuesta de hembras vírgenes a extractos de la glándula salival de machos.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico. El material biológico fue obtenido en la planta MOSCAMED localizada en Metapa, Chiapas. Las pupas y adultos se mantuvieron en laboratorio en jaulas de 30 cm³ cubiertas con tela transparente, con una temperatura de 28 °C, H.R. de 60 a 70% y un fotoperiodo de 8 horas. Los adultos se alimentaron con una mezcla de en proporción 1:3 de levadura hidrolizada enzimáticamente (ICN, Biomedical, Inc.): azúcar y agua. Los machos inmediatamente dos días después de emerger se aislaron para prevenir interacciones con las hembras.

Bioensayos. Para determinar el periodo de mayor actividad sexual de *A. obliqua*, se colocaron 25 machos y 25 hembras vírgenes en una jaula de 30 cm³ cubierta con tela transparente. Los bioensayos se realizaron en un laboratorio libre de feromona sexual. Para cada observación se utilizaron moscas de diferentes edades partiendo de 3er. hasta a los 15 días. Las observaciones se realizaron en diferentes periodos del día 7.00-9.00 h, 9.00-11.00 h, 15.00-17.00 h y 17.00-19.00 h. En cada observación se contaron el número de parejas copulando.

Colecta de volátiles. Los volátiles se colectaron utilizando un matraz de 500 ml con boca esmerilada 24/40 en donde se colocaron 50 machos edad maduros de 7-10 días de edad. Se pasó a través del matraz aire previamente purificado con carbón activado a un flujo de 30 ml/min. Los volátiles emitidos por los machos fueron arrastrados por la corriente de aire y se atraparon en un tubo (10 cm x 5 mm) empacado con 3 gr de Tenax, durante 2 h. Posteriormente, los compuestos adsorbidos se extrajeron con 3 ml hexano. El extracto hexánico obtenido se concentró hasta 10 µl bajo un flujo de nitrógeno, para su posterior análisis químico.

Obtención de extractos glandulares. Se obtuvieron glándulas salivales, disectando machos sexualmente maduros de 7-11 días de edad. Las disecciones se llevaron a cabo utilizando un microscopio estereoscópico con un par de pinzas de disección. Las glándulas disectadas fueron depositadas en un vial de 5 ml conteniendo 2 ml de hexano. Las glándulas se maceraron, una vez obtenido el extracto en un frasco de

vidrio se concentró bajo un flujo de nitrógeno a un volumen de 10 μ l.

Glándula salival en capilar de vidrio. Glándulas disectadas de machos sexualmente maduros durante el periodo de llamado, se colocaron en un fragmento de vidrio. Posteriormente se colocó en el interior de un capilar de 2 cm de largo, previamente sellado de un extremo, después de depositar la glándula en el capilar se procedió a sellar el siguiente extremo, verificándose el sello total de ambos lados, para su análisis por cromatografía de gases (Morgan 1990).

Bioensayos con extractos de glándulas. Para evaluar la respuesta de hembras vírgenes de *A. obliqua* (7-11 días de edad) a los extractos de glándulas salivales de machos, se introdujeron 20 hembras vírgenes dentro de una jaula de 30 cm³. Se obtuvieron glándulas salivales, disectando machos durante el periodo de llamado. Cinco glándulas recién disectadas se colocaron en papel filtro y se maceraron, inmediatamente el papel filtro se colocó en la parte superior de la jaula. Como control se utilizó papel filtro húmedo y se colocó a lado opuesto de la muestra, ubicada en forma vertical en una esquina de la jaula. Una hora antes de llevar a cabo el experimento se procedió a retirarles el alimento. Se contarón el número de moscas que visitaron a los papeles filtros. Las observaciones se repitieron cinco veces en espacios de cada 1 min. durante 10 min.

Análisis químico. El análisis químico de los extractos glandulares y de volátiles se efectuó en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (CG/EM), marca Varian Saturn 4D con una columna capilar no polar (DB-1). La temperatura de la columna fue de 50 °C manteniéndose por 2 minutos para posteriormente incrementarse por 15 °C/min hasta alcanzar la temperatura de 280 °C permaneciendo 5 min. La temperatura del Detector de flama fue de 300 °C y la del inyector de 200 °C. El gas de arrastre que se utilizó fue el gas Helio. El análisis químico de las glándulas salivales en capilar en un Cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3600 con una columna capilar no polar (DB-1), en las mismas condiciones en las que se utilizó el GC-MS. La inyección de las muestras en los capilares se realizó con la ayuda de un accesorio adaptado al Cromatógrafo de gases para el análisis de muestras sólidas.

Microscopía electrónica. Glándulas salivales disectadas de machos de *A. obliqua* se sometieron a un previo tratamiento antes de realizar las observaciones en el microscopio electrónico de barrido convencional, el cual consistió en un proceso de fijación en glutaraldehído al 3% en buffer fosfatos con un pH de 7.2 previos lavados en solución Buffer, posterior a la fijación se sometió a un procesamiento de

deshidratación en grado alcohol utilizándose etanol al 10% llevándose gradualmente hasta etanol al 100%, continuándose con el secado al punto crítico, por último la muestra tratada fue recubierta con un metal conductor (oro-paladio) ionizado. La observación de la glándula se efectuó con un microscopio electrónico de barrido convencional marca Topcon, modelo SM-510, el secado de la glándula se llevó a cabo con un secador al punto crítico (CO₂), marca SPI, modelo SPI-DRY CPD, y se utilizó el depositador de metal conductor (oro-paladio) marca Denton Vacuum, modelo Desk II. El segmento ventral y el segmento anal se examinaron directamente y también siendo tratadas para observación de muestras húmedas en MEB.

Cuadro 1

Actividad sexual de *Anastrepha obliqua*. Número promedio de apareamientos (N=5). Edad (días).

Hora	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total
7-9	0	0	2	2	4	6	10	9	10	4	3	4	2	56
9-11	0	0	0	2	1	3	2	2	1	3	1	0	0	15
11-13	0	0	1	0	3	0	2	2	3	2	0	2	1	16
15-17	0	0	0	0	1	2	3	3	2	1	0	0	1	13
17-19	0	0	0	1	0	2	1	1	0	1	0	1	0	7
Total	0	0	3	5	9	13	18	17	16	11	4	7	4	

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Cuadro 1, se muestran los resultados obtenidos de las observaciones del comportamiento de apareamiento de *A. obliqua* en condiciones de laboratorio. Se observó que los machos desde los 5 días comenzaron a mostrar el comportamiento sexual característico que comprende, aleteo constante, el aumento de tamaño de los laterales del abdomen en la región del 6to. esternito y la proyección al exterior de los tejidos anales. El mayor número de apareamientos se observó en el periodo de 7 a 10 días de edad. Se observó también que el periodo de mayor actividad de apareamiento se presentó por las mañanas en el periodo de 7-9 h. Aunque se observaron apareamientos durante toda la mañana, tarde y noche. Estos resultados están de acuerdo a las observaciones realizadas en plantaciones de mango por Aluja y Birke (1993), quienes observaron que el mayor número de cópulas ocurrieron en la mañana y algunas cópulas se observaron en la tarde. Al igual que *A. obliqua*, otras especies de *Anastrepha* tienen preferencia para copular en ciertas horas del día, por ejemplo *A. suspensa*, copula en la tarde entre 15 y 17 horas (Burk, 1983). Se ha

demostrado que los machos de *A. ludens* de 4 a 9 días de edad atraen a hembras en pruebas de laboratorio (Enkerlin *et al.* 1975) y las cópulas ocurren en la tarde y entrando la noche (Baker *et al.* 1944). *A. fraterculus* según Malavasi *et al.* (1983) copula en la mañana.



Fig. 1. Micrografía electrónica de la glándula salival de machos de *Anastrepha obliqua*, 50x.

Microscopía Electrónica. En las muestras analizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB), se observó la estructura compleja que presenta la glándula salival del macho de *A. obliqua* (Fig. 1), encontrándose que similar a las glándulas salivales presentadas por otras especies de *Anastrepha* (Nation 1989). Las micrografías obtenidas de la porción anal, permiten observar la proyección del ano hacia el exterior (Fig. 2) y también el tejido en moscas en posición normal (Fig. 3). El efecto de proyectar el tejido anal al exterior y las protuberancias presentadas en la porción lateral abdominal evidencian una posible liberación de los componentes feromonales. Para *A. suspensa* se ha reportado que la glándula salival contiene una lactona y un sesquiterpeno (Nation 1989).

Biensayos. Los resultados obtenidos en los bioensayos realizados para conocer la respuesta de hembras vírgenes de *A. obliqua* de 7-11 días de edad a extractos glandulares, muestran una respuesta positiva de atracción.

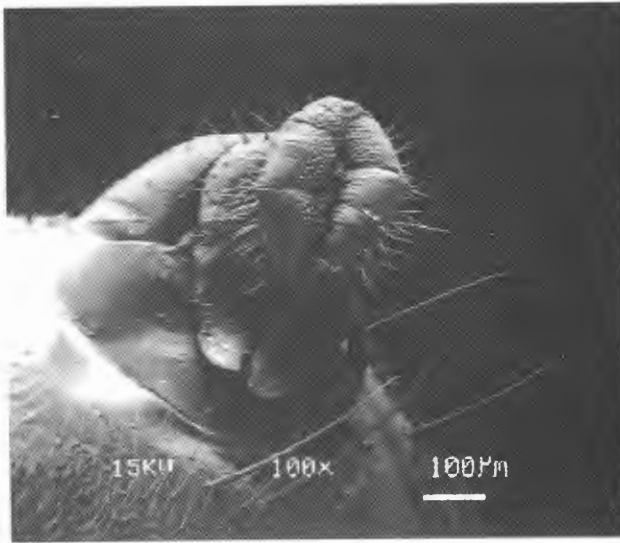


Fig. 2. Micrografía del tejido anal proyectado al exterior del macho de *Anastrepha obliqua*, 100x, observado por MEB convencional.



Fig. 3. Micrografía del tejido anal del macho de *Anastrepha obliqua* en su posición normal, 200x, por MEB convencional.

Ibáñez y Cruz: Componentes en glándulas salivales de *Anastrepha*

Las glándulas salivales de los machos de la mosca de la fruta de *A. obliqua* fueron atractivas a hembras vírgenes maduras. En los bioensayos se probó el efecto de 5 machos equivalentes, como se observa en la Fig. 4, el arribo fue más notorio a los 3 minutos y muchas moscas permanecían sobre la muestra más tiempo. Se realizaron 5 repeticiones. Nuestros experimentos indican que las glándulas no solo atrajeron a corta distancia sino que tuvieron un efecto arrestante como fue observado también con *A. fraterculus* (De Lima *et al.* 1996).

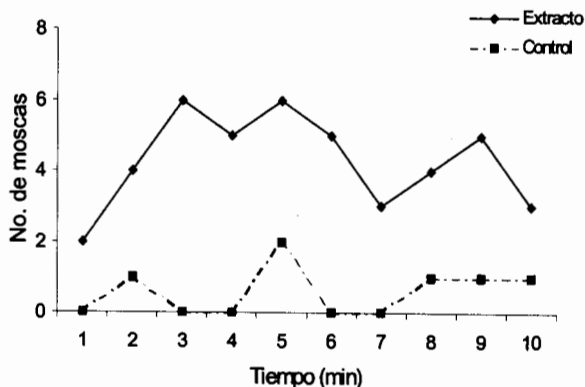


Fig. 4. Respuesta de hembras vírgenes de *Anastrepha obliqua* a extractos de glándulas salivales de machos.

Identificación Química. El análisis por CG-MS del extracto de captura de volátiles de machos de *A. obliqua* se muestra en el cromatograma de la Fig. 4. Se observa la presencia de tres compuestos volátiles, uno de ellos identificado como un alcohol (pico 1), (*E,E*)- α -farneseno (pico 2) y el pico 3 identificado como un sesquiterpeno. Sin embargo, recientemente Heath *et al.* (2000) reportó la identificación del pico (1) y el pico (3) como (*Z*)-nonenol y (*E,Z*)- α -farneseno respectivamente. El análisis CG-EM del extracto de glándulas salivales mostró que la glándula contiene los compuestos identificados como pico 2 y 3 (Fig. 5). La confirmación de la identificación del (*E,E*)- α -farneseno se llevó a cabo mediante la inyección de la sustancia sintética. En el análisis de las glándulas salivales en tubos capilares se observaron también los mismos componentes del extracto de glándulas. Estos resultados nos muestran que en las glándulas salivales se producen únicamente los compuestos sesquiterpenicos (picos 2 y 3) de la mezcla de la feromona sexual de *A. obliqua*. Las moscas producen 42.8 ng (pico 2) y 15.6 ng de (*E,E*)- α -farneseno. El componente identificado en *A. obliqua* el (*E,E*)- α -farneseno se ha identificado como principal componente de la feromona sexual de *A. fraterculus* (De lima *et al.* 1994), pero también se ha reportado para *A.*

ludens y *A. suspensa* (Rocca *et al.* 1992). Algunos de los compuestos liberados por *A. ludens*, *A. suspensa* y *A. fraterculus* están presentes en las glándulas salivales de machos de *A. obliqua*. Sin embargo anastreфина la cual es el principal componente de la feromona sexual de *A. ludens* y *A. suspensa* y (*E,E*)-suspensolide no se detectaron en *A. obliqua*. El hecho de que *A. obliqua*, *A. ludens*, *A. suspensa* y *A. fraterculus* producen componentes feromonaes similares parece estar relacionado con su filogenia. Análisis de ADN mitocondrial y ribosomal indican que el complejo *A. fraterculus*, *A. suspensa*, *A. ludens* y *A. obliqua* se encuentran en un mismo grupo de especies (Mcpheron, *et al.* 2000).

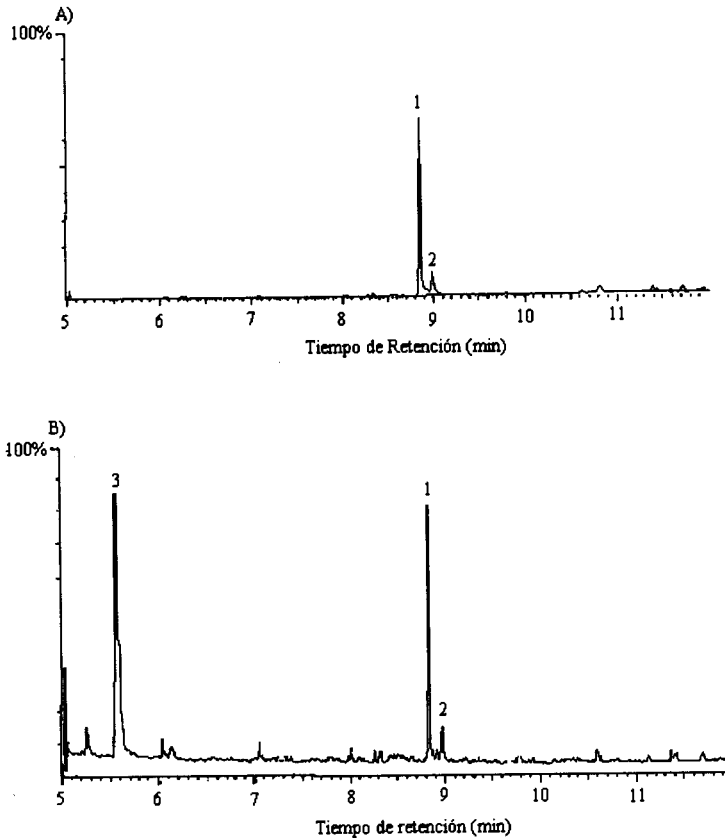


Fig. 5.- Cromatogramas A) del extracto de glándulas salivales de machos de *Anastrepha obliqua* B) de los componentes feromonaes obtenidos por captura de volátiles a partir de machos de *A. obliqua*. Los picos numerados han sido identificados como (1) (*E,Z*)- α -farneseno (2) (*E,E*)- α -farneseno y (3) (*Z*)-3-Nonenol.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce la colaboración a la M. en C. Guadalupe Nieto por la obtención de las micrografías en el Microscopio Electrónico de ECOSUR. A MOSCAMED por facilitar el material biológico para realizar este trabajo. Al Técnico Gustavo Rodas por apoyar en la obtención del material biológico. Este artículo representa una contribución al proyecto 2279-PB patrocinado por el CONACYT.

LITERATURA CITADA

- ALUJA, M. Y A. BIRKE. 1993. Habitat use by *Anastrepha obliqua* flies (Diptera: Tephritidae) in a mixed mango and tropical plum orchard. *Annals Entomological Society of America* 86: 799-812.
- BAKER, A.C., A.C. STONE, W.E. STONE, C.C. PLUMMER Y M. MCPHAIL. 1944. A review of studies on the Mexican fruit fly and related Mexican species. *United States Department Agriculture Miscellaneous Publications* 531: 1-155.
- BATTISTE, M. A., L. STREKOWSK, P. VANDERBILT, M. VISNICK, R.W. KING Y J.L. NATION, 1983. Anastrephin and Epianastrephin, novel lactone components isolated from the sex pheromone blend of male Caribbean and Mexican fruit flies. *Tetrahedron Letters* 24:2611-2614.
- BARROS, M.D. Y A. MALAVASI, 1996. Morphology of adult male rectum of seven species of *Anastrepha* from Brazil and mating behavior correlations, pp. 101-105. En: B. A. McPherson and G. J. Steck (Eds). *Fruit Fly Pests. A World Assessment of Their Biology and Management*. St Lucie Press.
- BURK, T. 1983. Behavioral ecology of mating in the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 66: 330-344.
- CHUMAN, T., J. SIVINSKI, R.R. HEATH, C.O. CALKINS, J.H. TUMLINSON, M.A. BATTISTE, R.L. WYNDRA, L. SSTROWSKI Y J.L. NATION, 1988. Suspensolide, a new macrolide component of male caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (loew)) volátiles. *Tetrahedron Letters* 29:6561-6564.
- DA COSTA TELES, M. Y Y.J. POLLONI, 1989. Structure and development of specific sex glands in males of some Brazilian fruit flies of the genus *Anastrepha* Shiner, 1868 (Diptera, Tephritidae), pp. 179-189. En: A. A. Balkena (Ed.). *Fruit flies of economic importance*. Rotterdam. USA.
- DE LIMA I.S., P.E. HOWSE Y I.D.R. STEVENS, 1994. Volatile Components from the Salivary Glands of Calling Males of the South American Fruit Fly, *Anastrepha fraterculus*: Partial Identification and Behavioural Activity, pp. 107-113. En: McPherson B.A. and G.J. Steck (Eds.). *Fruit Fly Pests. A World Assessment of Their Biology and Management*. St Lucie Press.
- DODSON, G.N. 1978. *Behavioral, anatomical, and physiological aspects of reproduction in the Caribbean fruit fly, Anastrepha suspensa (Loew)*. M. S. Thesis, University of Florida, Gainesville, FL.
- ENKERLIN, D., D.A. STEER Y E. GONZALEZ, 1975. Pheromone and radiation studies for the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew). *Report to Insect Eradication of Pest Control Section FAO/IAEA División, Vienna, Austria*.
- Esponda-Gaxiola, R. E. 1977. *Contribución al estudio químico del atrayente sexual de la mosca Mexicana de la fruta "Anastrepha ludens (Loew)"*. Tesis, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Monterrey, N.L., México.
- HEATH, R.R., P.J. LANDOLT, D.C. ROBACHER, B.D. DUEBEN Y N.D. ESPKY, 2000. Sexual pheromones of tephritid flies: clues to unravel phylogeny and behavior, pp. 793-809. En: M. Aluja y N. Allen (Eds). *Fruit Flies (Tephritidae) Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press LLC.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. 1992. *El género Anastrepha Schiner en México (Diptera: Tephritidae)*. *Taxonomía*,

- distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología, Publ. No. 33, Xalapa, Veracruz, México. 162 pp.
- MCPHERON, B. A., H-Y HAN, J.G. SILVA Y A. L. NORROBON, 2000. Phylogeny of the Genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Ttyetinae: Toxotrypanini) Based upon 16S rRNA Mitochondrial DNA Sequences, pp. 343-361. En: M. Aluja y N. Allen (Eds.). *Fruit Flies (Tephritidae) Phylogeny and Evolution of Behavior*. CRC Press LLC.
- MORGANTE, J.S., A. MALAVASI Y R.J. PROKOPY, 1983. Mating behavior of wild *Anastrepha fraterculus* flies (Diptera: Tephritidae) on a caged host tree. *Florida Entomologist* 66: 234-241.
- MALAVASI, A., J.S. MORGANTE Y R.J. PROKOPY, 1983. Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera : Tephritidae) flies on host and non-host trees in nature. *Annals Entomological Society of America* 76: 286-292.
- NATION, J.L. 1972. Courtship behavior and evidence for a sex attractant in male Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Annals Entomological Society of America* 65: 1364-1367.
- NATION, J.L. 1974. The structure and development of two sex specific glands in male Caribbean fruit flies. *Annals Entomological Society of America* 67: 731-734.
- NATION, J.L. 1975. The sex pheromone blend of Caribbean fruit fly males: isolation, biological activity and partial chemical characterization. *Environmental Entomology* 4:27-30.
- NATION, J.L. 1977. Pheromone research in tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the International Society of Citriculture*, 2: 481-485.
- NATION, J.L. 1981. Sex-specific glands in tephritid fruit flies of the genera *Anastrepha*, *Ceratitis*, *Dacus*, and *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 10: 121-129.
- NATION, J.L. 1983. Sex pheromone of the Caribbean fruit fly: chemistry and field ecology, pp. 109-110. En: J. Miyamoto y P.C. Kearney (Editores), IUPAC *Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment*, vol. 2. Pergamon Press, New York..
- NATION, J.L. 1989. The role of pheromones in the mating system of *Anastrepha* fruit flies, pp. 189-205. En: Robinson, A.S. y G. Hooper (Eds.). *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3A, Elsevier, Amsterdam.
- NATION, J.L. 1990. Biology of pheromone Release by male caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae). *Journal Chemical Ecology* 16: 553-571.
- NATION, J.L. 1991. Sex pheromone components of *Anastrepha suspensa* and their role in mating behavior, pp. 233-245. En: K. Kawasaki, O. Iwahashi y K. Kaneshiro (Eds.), *Biology and Control of Fruit Flies*. (Proc. Int. Symp. Okinawa, Japan 1991), Ginowan, Okinawa, Japan.
- PERDOMO, A.J. 1974. *Sex and aggregation pheromone bioassays and mating observations of the Caribbean fruit fly, Anastrepha suspensa (Loew) under field conditions*. Ph.D. Disertation, University of Florida, Gainesville, FL.
- ROBACKER, D.C. Y W.G. HART, 1985a. Courtship and territoriality of laboratory reared Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, (Diptera:Tephritidae), in cages containing host and nonhost trees. *Annals Entomological Society of America* 78: 488-494.
- ROCCA, J.R., J.L. NATION, L. STROKOWOSKI Y M. BATTISTE, 1992. Comparison of volátiles Emitted by Male Caribbean and Mexican fruit flies. *Journal Chemical Ecology* 18:223-244.
- STOKES, J.B., E.C. UEBEL, J.D. WARTHEN, JR., M. JACOBSON, J.L. FLIPPEN-ANDERSON, R. GILARDI, L.M., SPISHAKOFF Y K.R. WILZER, 1983. Isolation and identification of novel lactones from male Mexican fruit flies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31:1162-1167.

Recibido: 4 julio 2000.

Aceptado: 8 marzo 2001.