

## EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE LA CEPA SEXADA GENETICAMENTE TAPACHULA-7 DE *Anastrepha ludens*, LOEW (DÍPTERA: TEPHRITIDAE)

Ángel Humberto de León-Crisostomo<sup>1</sup>, Cristina Silvia Zepeda-Cisneros, José Salvador Meza-Hernández. Programa Moscafrut, Acuerdo SAGARPA-IICA. Subdirección Sexado Genético. Camino a los Cacahotales S/N, Metapa de Domínguez, Chiapas. México. C. P. 30860. <sup>1</sup>Angel\_cri5@hotmail.com

**RESUMEN:** La mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens*, es una plaga de importancia económica en nuestro país. Como un método de control se aplica la técnica del insecto estéril (TIE). Para aumentar la eficacia de la TIE, se desarrolló una cepa de sexado genético (CSG), llamada "Tapachula - 7". Esta CSG hace posible la diferenciación de los sexos, mediante el color de pupa (pupario negro: hembra y pupa café: macho). La construcción de la CSG se basa en una translocación Y-autosoma, bajo esta condición la inestabilidad más frecuente es la recombinación meiotica, en machos heterocigotos. En este trabajo, hemos incorporado una cepa con recombinación suprimida (cepa I<sub>133</sub>) en la CSG Tapachula - 7, una vez incorporada la CSG fue evaluada para determinar si la incorporación causó una reducción en el nivel de recombinación y si la capacidad reproductiva es afectada. Los resultados mostraron que la incorporación de esta cepa afectada significativamente a la CSG Tapachula - 7, donde el nivel de recombinación no fue reducido.

Palabras clave: *Anastrepha ludens*, técnica del insecto estéril, cepa sexada genéticamente, recombinantes, translocación, Tapachula-7.

### Evaluation of stability genetic sexing strain Tapachula-7 *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae)

**ABSTRACT:** The Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens*, is a pest of economic importance in our country. As a method of control the sterile insect technique (SIT) is applied. To increase the efficiency of the SIT, a genetic sexing strain (GSS), called "Tapachula-7" was developed. This GSS makes possible the sex differentiation by the puparium color (black puparium: female and brown puparium: male). The construction of the GSS is based on Y-autosome translocation, under this condition the most frequent cause of instability is autosomal recombination in males heterozygous for the selectable marker. In this work, we incorporated a strain described with suppressed recombination (I<sub>133</sub> strain) to the GSS Tapachula-7, and once incorporated the GSS was tested to determine if the incorporation caused a reduction in the level of recombination and if their fitness was not altered. The results showed that the incorporation of this strain affected significantly the fitness of the GSS Tapachula-7 and the level of recombination was not reduced.

Key words: *Anastrepha ludens*, sterile insect technique, genetic sexing strains, recombinants, translocation, Tapachula-7.

### Introducción

La Técnica del Insecto Estéril (TIE) ha sido utilizada con éxito para el control de plagas alrededor del mundo (Dyck *et al.*, 2005). Se ha demostrado que su eficiencia será incrementada si se incorporan Cepas Sexadas Genéticamente (CSG), con las cuales es posible la liberación única de machos. Obteniendo además otras ventajas como evitar gastos en las hembras en el empaque y liberación (Rendón, *et al.*, 1998. Fisher y Cáceres., 2000). En la mosca Mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens*, ha sido construida una CSG que permite identificar los sexos por la coloración de la pupa y como característica produce machos tipo silvestre (pupa café) y hembras mutadas "pupa negra" (*bp*) (Meza *et al.*, 2008, Zepeda-Cisneros *et al.*, 2012). Esta CSG porta una translocación recíproca, entre el autosoma portador del marcador *bp* y el cromosoma sexual Y. Actualmente esta CSG ha recibido el nombre de Tapachula-7 y está siendo criada a nivel semi-masivo (Zepeda-Cisneros *et al.*, 2010). La estabilidad genética de este tipo de líneas se ve amenazada por la recombinación meiótica, que aunque en bajas proporciones se presenta en los machos. Sin embargo es necesario

implementar un sistema filtro, cuando estas son criadas a gran escala logrando mantener líneas que conservan su sistema de sexado, ya que se eliminan los recombinantes evitando su reproducción y acumulación en la colonia (Fisher y Cáceres., 2000). Pero otra estrategia genética muy útil es eliminar a los recombinantes incorporando una inversión dentro del fragmento involucrado en la translocación. Recientemente se desarrollaron varias líneas con recombinación suprimida entre los alelos *bp* e *im* (Ibáñez-Palacios *et al.*, 2010) y una de ellas ha sido utilizada para cruzarla con la CSG Tapachula-7 incorporándole la inversión con el objetivo de mejorar su estabilidad genética.

## **Materiales y Método**

**Lugar de estudio.** El experimento se llevó a cabo en las instalaciones de la subdirección de Sexado Genético, Programa Moscafrut (Acuerdo SAGARPA-IICA), localizado en Metapa de Domínguez Chiapas.

**Condiciones de cría.** Las condiciones ambientales para la cría se mantuvieron con fotoperiodos de 12 horas luz, a temperaturas de 24-25°C y humedades del 70±5%. Una vez que los insectos alcanzaron la madurez sexual (10 días), se colectó el huevo, por un periodo de 7 horas (7:00 a 14:00 horas). Los insectos se criaron en dieta artificial a base de polvo de olote usado en la cría masiva de la planta Moscafrut (Flores-García *et al.*, 2012).

**Evaluación de la Estabilidad genética de la CSG Tapachula-7.** La evaluación se realizó durante 10 generaciones sin utilizar el sistema de filtro. Cada generación, se constituyó con 15,000 pupas que fueron colocadas dentro de jaula de madera de 50x70x80 cm, revestidas con malla tul, provistas de agua y alimento. Encada generación se muestreó 100 ml de pupa para monitorear la estabilidad de la línea, estas pupas se separaron por color y se esperó la emergencia del adulto. Identificando y registrando el número de insectos medios emergidos, deformes y recombinantes. Estos últimos son aquellos que no corresponden al tipo de sexo esperado para cada fenotipo de pupa, por ejemplo machos de pupa negra y hembras de pupa café.

**Cruza: CSG Tapachula-7xLínea I<sub>133</sub>.** Se utilizaron individuos hembras de la línea con recombinación suprimida I<sub>133</sub>. Doscientos machos de la CSG Tapachula-7. Se cruzaron con 200 hembras de la línea I<sub>133</sub>. Los machos de las progenies de esta crua fueron retro-cruzados. Los insectos obtenidos de esta segunda crua fueron considerados como generación F<sub>1</sub> estableciéndose de esta forma la línea Tap-7/I<sub>133</sub>. Para la línea control se realiza de la misma manera, doscientos machos de la CSG Tapachula-7 con 200 hembras de la línea *bp/bp*, los insectos que se obtuvieron de la segunda crua fueron la F<sub>1</sub> estableciéndose de esta forma la Tap-7/control.

**Atributos biológicos.** Se evaluaron para las líneas: Tap-7/I<sub>133</sub> y la Tap-7/control. Se evaluaron los atributos biológicos a través del método previamente descrito por Meza *et al.*, 2010, se realizaron 15 réplicas por generación.

**Análisis de datos.** A partir de la información obtenida de cada una de las líneas, se efectuó un análisis de varianza, bajo un diseño completamente al azar. Seguido de una prueba de Tukey para la comparación de medias ( $\alpha$  0.05).

## **Resultados y Discusión.**

En la estabilidad genética de la CSG Tapachula-7, Durante todas las generaciones de la evaluación de la estabilidad genética (Cuadro 1), una mayor proporción de pupa café (*bp*<sup>+</sup>) fue observada (54.16%). Este sesgo favorece a la producción de machos e incrementa la efectividad de la cría masiva, ya que la eliminación de individuos producidos no destinados a la liberación es menor al 50% esperado (pupario negro: hembra).

Cuadro 1. Estabilidad Genética de la CSG Tapachula-7.

F:	No de pupas		Total de Pupas	No. de adultos								Total de Insectos	% Rec.
	<i>bp</i>	<i>bp</i> <sup>+</sup>		<i>bp</i>				<i>bp</i> <sup>+</sup>					
				♀ <i>bp</i>	♂ <i>bp</i>	♀ <i>bp</i> ½ Emergidas	♀ <i>bp</i> Deformes	♂ <i>bp</i> <sup>+</sup>	♀ <i>bp</i> <sup>+</sup>	♂ <i>bp</i> <sup>+</sup> ½ Emergidas	♂ <i>bp</i> <sup>+</sup> Deformes		
P	935	1072	2007	709	0	20	3	1009	0	9	2	1718	0
F <sub>1</sub>	1058	1450	2508	1045	0	14	16	1311	0	15	5	2356	0
F <sub>2</sub>	1299	1348	2647	1142	0	16	9	1262	0	16	6	2451	0
F <sub>3</sub>	1185	1499	2684	1026	0	12	4	1410	1	12	8	2473	0.04
F <sub>4</sub>	1178	1198	2376	1051	0	6	3	1159	0	6	5	2230	0
F <sub>5</sub>	1135	1304	2439	856	0	12	8	1009	0	15	12	1912	0
F <sub>6</sub>	1294	1405	2699	919	0	146	49	1023	0	60	19	2216	0
F <sub>7</sub>	1134	1408	2542	849	0	33	7	1103	0	22	9	2023	0
F <sub>8</sub>	834	968	1802	606	5	17	41	808	17	6	12	1512	1.5
F <sub>9</sub>	831	1188	2019	641	1	37	17	1027	9	7	4	1743	0.57
F <sub>10</sub>	938	1096	2034	713	0	12	3	986	13	6	3	1699	0.76

Los datos reflejaron ausencia de recombinación en las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>7</sub> siendo que en la generación F<sub>3</sub> se registró el 0.04% de recombinación, en la generación F<sub>8</sub> y F<sub>9</sub> fue donde se registró en promedio una recombinación del 0.94% (Cuadro 1). Los insectos recombinantes, fueron preponderantes en las hembras, las cuales se incrementaron notablemente en las últimas generaciones. Este incremento significativo de los recombinantes podría alertarnos que sin la aplicación del sistema de filtrado, el aumento de recombinantes podría llegar a poner en riesgo la integridad de la CSG Tapachula-7.

Tanto la Tap-7/I<sub>133</sub> como la Tap-7/control iniciaron con 200 parejas. En las generaciones F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub> no se encontraron individuos recombinantes en ambas líneas. Sin embargo a partir de la generación F<sub>4</sub>, donde se revisaron más de 4500 insectos para cada una, la Tap-7/control inició con presencia de recombinantes (0.02%), mientras que la Tap-7/I<sub>133</sub> se mantuvo sin recombinantes hasta la F<sub>5</sub> donde se revisaron aproximadamente más de 12000 adultos. En general ambas líneas presentaron un porcentaje de recombinación promedio del 0.01% (Cuadro 2).

Para la F<sub>6</sub>, se presentó una recombinación del 0.05 en la Tap-7/I<sub>133</sub> (Tabla 2), esto nos indica que cuando la Tap-7/I<sub>133</sub> es producida en mayor proporción la recombinación aparece y se iguala a la Tap-7/control. Tales resultados sugieren que la supresión de recombinación lograda entre los alelos *bp* e *im* de la línea I<sub>133</sub>, no impacta de manera significativa en la recombinación existente entre el alelo *bp* y el punto de quiebra ocurrido durante la translocación de la CSG Tapachula-7, como en el caso reportado para la CSG VIENNA 8 de la mosca del Mediterráneo *C. capitata*, donde la incorporación de una línea invertida redujo significativamente la recombinación en la CSG VIENNA 8 (Franz, 2005).

Cuadro 2. Maximización de la Tap-7/I<sub>133</sub>y Tap-7/Control.

Cepa	F:	No de pupas			No. de adultos								Total	% REC	% de Emergencia
		<i>bp</i>	<i>bp</i> <sup>+</sup>	Total	<i>bp</i>				<i>bp</i> <sup>+</sup>						
					♀	♂	♀ ½ Emergidas	♀ Defor mes	♀	♂	♀ ½ Emergidas	♀ Defor mes			
Tap-7/control	C1	0	0	0	200	0	0	0	200	0	0	0	400	0	0
	C2	0	0	0	200	0	0	0	200	0	0	0	400	0	0
	F <sub>1</sub>	1854	2145	3999	1330	0	45	20	1833	0	21	20	3203	0	80.10
	F <sub>2</sub>	1572	1673	3245	1226	0	22	9	1298	0	3	28	2524	0	78.92
	F <sub>3</sub>	952	1049	2001	867	0	9	2	965	0	5	1	1835	0	91.70
	F <sub>4</sub>	2577	2786	5363	2132	1	41	6	2413	0	18	6	4558	0.02	84.99
	F <sub>5</sub>	7362	8515	15877	5330	0	120	234	7218	1	65	51	12834	0.01	80.83
	F <sub>6</sub>	2932	3420	6352	2579	1	42	23	3070	1	24	13	5687	0.04	89.53
<b>TOTAL</b>	<b>17249</b>	<b>19588</b>	<b>36837</b>	<b>13864</b>	<b>2</b>	<b>279</b>	<b>294</b>	<b>17197</b>	<b>2</b>	<b>136</b>	<b>119</b>	<b>31441</b>	<b>0.01</b>	<b>84.35</b>	
Tap-7/I <sub>133</sub>	C1	0	0	0	200	0	0	0	200	0	0	0	400	0	0
	C2	0	0	0	200	0	0	0	200	0	0	0	400	0	0
	F <sub>1</sub>	653	1336	1989	482	0	40	32	685	0	10	13	1220	0	60.94
	F <sub>2</sub>	838	821	1656	520	0	17	19	706	0	7	2	1226	0	75.17
	F <sub>3</sub>	646	622	1268	544	0	12	8	572	0	4	3	1131	0	88.88
	F <sub>4</sub>	2565	3056	5621	2060	0	40	16	2649	0	7	10	4759	0	84.24
	F <sub>5</sub>	7362	8818	16180	5491	0	71	139	6525	0	43	81	12168	0	75.62
	F <sub>6</sub>	2864	3878	6742	2465	1	26	28	3209	2	26	38	5741	0.05	85.18
<b>TOTAL</b>	<b>14928</b>	<b>18531</b>	<b>33456</b>	<b>11962</b>	<b>1</b>	<b>206</b>	<b>242</b>	<b>14746</b>	<b>2</b>	<b>97</b>	<b>147</b>	<b>27045</b>	<b>0.01</b>	<b>78.34</b>	

685

En los atributos biológicos la fertilidad en la generación F1 de la Tap-7/I<sub>133</sub>, reflejó una diferencia del 12.59% menor a la del Tap-7/Control. Para las siguientes generaciones F<sub>2</sub>, F<sub>4</sub>, F<sub>5</sub>, se observaron resultados similares (Tabla 3), lo que sugiere una descompensación genética mayor a una simple translocación, ya que una fertilidad esperada para individuos con translocaciones simple es del 50%. Franz (2005) menciona que cromosómicamente las deleciones presentan una letalidad completa, mientras que en las triplicaciones es posible la sobrevivencia hasta la fase de adulto, siendo que para la Tap-7/Control se mantuvo cerca del 65%.

Los resultados de larva y pupa indican que la Tap-7/I<sub>133</sub> estuvo por debajo de la Tap-7/Control, mostrando diferencias significativas en las tres últimas generaciones (Cuadro 3). Estos resultados evidencian que la dinámica de muerte entre estadios se mantiene en la Tap-7/I<sub>133</sub> al mismo nivel que la Tap-7/Control, lo que provoca que el efecto negativo sea la fertilidad y que esta impacte en el resto de los estadios (Larva-Pupa-Adulto) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Evaluación de los Atributos biológicos de la Tap-7/I<sub>133</sub> y la Tap-7/Control.

Generación	Cepas	Eclosión del huevo (% ± e.e.)	Supervivencia Huevo-Larva (% ± e.e.)	Supervivencia Larva-Pupa (% ± e.e.)	Emergencia (% ± e.e.)	L a
F <sub>1</sub>	Tap-7/Control	67.59±1.84 A	39.66±3.74 A	96.78±2.37 A	84.13±1.52 A	explica
	Tap-7/I <sub>133</sub>	55.00±1.42 B	31.33±2.88 A	97.96±1.39 A	85.19±2.83 A	
F <sub>2</sub>	Tap-7/Control	66.60±1.42 A	36.00±2.74 A	97.81±0.67 A	89.94±1.65 A	estos
	Tap-7/I <sub>133</sub>	52.60±1.27 B	27.13±2.88 B	99.06±0.60 A	88.97±2.88 A	
F <sub>4</sub>	Tap-7/Control	66.80±1.86 A	36.66±0.90A	98.58±0.66 A	79.02±3.56 A	dos
	Tap-7/I <sub>133</sub>	57.00±1.76 B	24.46±1.84 B	96.89±1.83 A	80.77±6.92 A	
F <sub>5</sub>	Tap-7/Control	59.73±1.96 A	36.80±1.96 A	97.84±0.63 A	86.93±2.31 A	estar
	Tap-7/I <sub>133</sub>	45.73±2.79 B	23.27±1.16 B	98.39±0.79 A	88.50±2.80 A	

por una translocación genética producida durante la creación de la línea I<sub>133</sub>, que involucra el cromosoma portador de estos alelos (*bp* e *im*), ya que un estudio similar al realizado para inducir inhibición en la recombinación de alelos ligados en *C. capitata*, reportó que la recombinación entre dos alelos fue suprimida debido a translocación del cromosoma portador de esta especie (Bush-Petersen 1986). Sin embargo a pesar de que la recombinación no fue reducida con la línea I<sub>133</sub> se tiene la posibilidad de estudiar nuevas líneas y para ser incorporadas a la CSG Tapachula-7 y poder inhibir la recombinación.

**Literatura Citada**

Dyck, V. A., J. Hendrichs, and A. S. Robinson. 2005. Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-wide Integrated Pest Management. Springer, Dordrecht, the Netherlands. 787pp.

Bush-Petersen and D. I. Southerm.1986. Induced suppression of genetic recombination in females of the Mediterranean fruit fly, *Keratitis capitata* (Wide), by translocation heterozygosis. *Genetica* 72: 161-169.

Fisher, K. T. and C. Cáceres. 2000. A filter rearing system for mass reared genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae), pp. 543-550. In Proceedings of the Fifth International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. 1-5 June, 1998, Penang, Malaysia

- Flores-García Héctor S, Emilio Hernández-Ortiz, Jorge Toledo Arreola. 2012. Desarrollo de un sistema de cría artificial para *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera: Tephritidae). *Acta zoológica Mexicana* 28(2) pp. 321-340
- Franz, G. 2005. Genetic Sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. Pp. 427-452, En; V. A. Dyck, J. Hendrichs and A. S. Robinson (Eds.) *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* Springer, Netherlands.
- Ibañez-Palacios Jorge, Zepeda-Cisneros Cristina S.& Garcia-Martinez Victor. 2010. Improvement of genetic sexing strains through the induction of chromosomal inversions in *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). In: 8th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. Valencia, España.
- Meza, J. S., C. S. Zepeda-Cisneros, S. Gálvez, V. García y H. Flores. 2008. Nuevas Líneas de Sexado Genético en la mosca Mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Díptera: Tephritidae) 7th meeting of the Working Group on Fruit Flies of the Western Hemisphere. Mazatlán Sinaloa. México (02-07 de noviembre).
- Meza, J. S., Nirmala. X., Zimowska. G, J., Zepeda-Cisneros, C. S., Handler, A. M., 2010. Development of transgenic strain for the biological control of the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens*. *Molecular Technologies to improve sit.*
- Rendon, P., D. McInnis, D. Lance and J. Stewart. Comparasion of medfly male-only and bisexual releases in large scale field trials. In area-wide control of fruitn flies and other insect pest: joint proceeding of the international conference in Area-wide control of insect Pest. May 28-Jun2, 1998. And the fifth international symposium on fruit flies of economic importance jone 1-5, 1998. Penang, Malaysia. 1<sup>st</sup>Edition, Editedby K. H. Tan. Penarbit. Malaysia.
- Zepeda-Cisneros, C.S. 2010. Desarrollo de cepas de Sexado Genético. En P. Montoya, J. Toledo y E. Hernández (eds.) *Moscas de la fruta: Fundamentos y Procedimientos para su manejo*. S y G editores, D.F. pp. 333-342.
- Zepeda-Cisneros C. S., J. S. Meza., J. Ibañez-Palacios., V. Garcia-Martinez., A. H. de León-Crisóstomo and H. S. Flores-García. 2012. Development and evaluation of genetic sexing strain of *Anastrepha ludens* for sterile insect technique. XXIV International Congress of Entomology 19-25 Augst. Daegu. Korea.