

## Ultraestructura del pupario de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)

I. MAYO, A. GARRIDO, M. MUÑIZ y E. M. ROBLES-CHILLIDA

La morfología del pupario de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) ha sido puesta de manifiesto a microscopía electrónica de barrido y transmisión.

La pared del pupario está formada por tres capas de distinta morfología y densidad electrónica: capa externa A, capa intermedia B y capa interna C. La capa A presenta a su vez, una zona periférica marcadamente electrón-transparente, con numerosas cavidades más o menos esféricas, mientras que la zona interna es notablemente más electrón-densa. La capa B presenta una morfología intermedia entre las capas A y C. La capa interna C, la de menor densidad electrónica, muestra una estructuración pseudocristalina y ausencia total de cavidades.

Se discute la morfología de las capas del pupario en función del grado de protección que confiere a la ninfa y en función de la capacidad de penetración de los agentes externos.

I. MAYO y E. M. ROBLES-CHILLIDA. Instituto «Santiago Ramón y Cajal», C.S.I.C. Velázquez, 144. 28006 Madrid.

A. GARRIDO. Departamento de Protección Vegetal, I.V.I.A. Apartado Oficial, Moncada, Valencia.

M. MUÑIZ. Instituto de Edafología y Biología Vegetal, C.S.I.C., Serrano, 117. 28006 Madrid.

**Palabras clave:** *Ceratitis capitata*, pupario, ultraestructura.

### INTRODUCCION

*Ceratitis capitata*, mosca mediterránea de la fruta, ha sido objeto de numerosos trabajos, ya que constituye una de las especies plaga de mayor impacto económico. Por esta razón, con la finalidad de llevar a cabo un control sobre este insecto, se han realizado estudios desde diversos puntos de vista, como la utilización de las feromonas como método de lucha (OHINATA *et al.*, 1973, 1977; PROKOPY *et al.*, 1978; FITT, 1981; ZÜMREOGLU, 1983), lucha química (MELLADO, 1970; ARMSTRONG, COUEY, 1984; KOREN *et al.*, 1984; RICE *et al.*, 1984) o técnica de machos estériles (FERON, 1965; MELLADO *et al.*, 1966, 1974).

Con respecto a la emergencia de las larvas de *Ceratitis capitata*, es de destacar los trabajos de MUÑIZ (1973, 1976, 1980), sobre la influencia de la presión osmótica,

formaldehído y soluciones electrolíticas sobre los huevos de esta especie, así como trabajos encaminados a determinar el comportamiento de este insecto en función de varios agentes (FERON, 1962; MUÑIZ, 1977; MUÑIZ, REY, 1979; MUÑIZ, MORA, 1981; MUÑIZ, GIL, 1984).

Desde el punto de vista morfológico, uno de los primeros trabajos realizados sobre *Ceratitis capitata*, fue llevado a cabo por RUIZ-CASTRO (1945), en donde se describe la morfología de todas y cada una de las fases evolutivas, a microscopía óptica. Posteriormente, ROBLES-CHILLIDA (1975) pone de manifiesto la morfología del corión, desarrollo embrionario y larva de *Ceratitis capitata*; la ultraestructura del corión fue determinada por DALLAI *et al.*, (1986) y la morfología ultraestructural de los quimiorreceptores del funículo, por MAYO *et al.* (1987).

Estudios sobre la morfología del pupario en Dípteros, han sido realizados recientemente por ROTHERAY (1986) y SKIDMORE (1986), sin embargo, existe un desconocimiento de la ultraestructura del pupario de *Ceratitis capitata* y su relación con el grado de protección que ofrece a la ninfa, así como la resistencia que ejerce el pupario a la penetración de sustancias químicas. Por esta razón, se ha considerado de interés realizar un estudio ultraestructural de pupario de *Ceratitis capitata*, dada la carencia de resultados en esta fase del desarrollo embrionario.

## MATERIALES Y METODOS

Los especímenes de *Ceratitis capitata* se obtuvieron de una población cultivada en el Instituto de Edafología y Biología Vegetal, C.S.I.C. de Madrid. Se utilizaron pupas de 6 días de edad, que fueron preparadas para su examen a microscopía electrónica de barrido (MEB) y transmisión (MET).

Para MEB, 10 pupas fueron deshidratadas al aire y cubiertas con oro en un evaporador a vacío. Las muestras fueron examinadas a 20 kv en un microscopio electrónico de barrido ISI 100 A.

Para MET, 10 pupas fueron cortadas a tres niveles: nivel 1, a través del casquete superior, nivel 2, a través de la zona media y nivel 3, a través del casquete inferior. Posteriormente fueron fijadas en tetróxido de osmio al 2% en tampón fosfato 0,25M durante dos horas a 4°C. La fijación fue seguida de deshidratación en una serie graduada de etanol y las muestras transferidas a 1,2 epoxy-propano. Las pupas fueron después mantenidas en una mezcla 50:50 de epoxy-propano y resina Epon durante 24 horas a temperatura ambiente.

Aproximadamente 200 cortes seriados ultrafinos fueron realizados con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Reichert OM U2. Los cortes fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados a 80 kv en un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 300.

Simultáneamente, llevamos a cabo algunos ensayos para determinar la supervivencia de las pupas y emergencia de los adultos. De

esta forma, se constituyeron 4 grupos de diez especímenes, que fueron sumergidos en una solución de tetróxido de osmio al 2% en tampón fosfato (0,25M, 4°C) durante 2, 4, 5 y 8 horas, respectivamente. Se observó emergencia después de estos tiempos de permanencia en el fijador en cada uno de los cuatro grupos.

## RESULTADOS

**MEB.**—El pupario de *Ceratitis capitata* tiene forma ovoide, alargada, de unos 4 mm. de longitud y 2 mm. de anchura. Su superficie externa presenta una serie de surcos, separados entre sí por una distancia de 450  $\mu$ m., aproximadamente, que se corresponden con las delimitaciones de los segmentos de la ninfa (fig. 1). El interior del pupario se encuentra tapizado por un material de aspecto membranoso (fig. 2).

**MET.**—La pared del pupario de *Ceratitis capitata* en el nivel 1, próximo a la línea de apertura (fig. 3), está formado por tres capas (A, B y C), más o menos delimitadas entre sí en lo que respecta a su morfología y distinta densidad electrónica.

En la capa externa A, se pueden distinguir dos zonas; la más periférica muestra una marcada electrón-transparencia, probablemente debido a la propia estructura esponjosa de esta zona, en la cual el número de

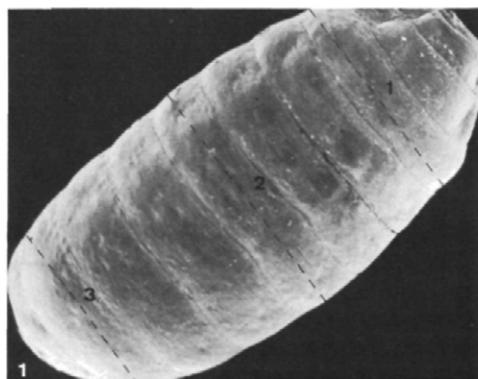


Fig. 1.—Microfotografía a microscopía electrónica de barrido de la pupa de *Ceratitis capitata*, mostrando los niveles por los que se seccionó el pupario para su posterior observación a microscopía electrónica de transmisión. X 35.



Fig. 2.—Microfotografía a microscopía electrónica de barrido del interior del pupario, mostrando el material membranoso. X 50.

formaciones cavernosas o cavidades más o menos esféricas, es muy abundante, distinguiéndose, aunque muy tenuamente, las paredes limitantes de las citadas cavidades. La zona más interna de la capa A, presenta un mayor engrosamiento a nivel de las paredes limitantes de las cavidades, adquiriendo un aspecto más compacto y, por lo tanto, mucho más electrón-denso. En su conjunto, esta capa externa A, de apariencia amorfa, muestra un aspecto reticular, sobre todo en su zona periférica. El grosor de la capa externa A es, aproximadamente, de  $5,7 \mu\text{m}$ .

La capa intermedia B, presenta una densidad electrónica similar a la zona inmediata superior de la capa A, si bien comienza a

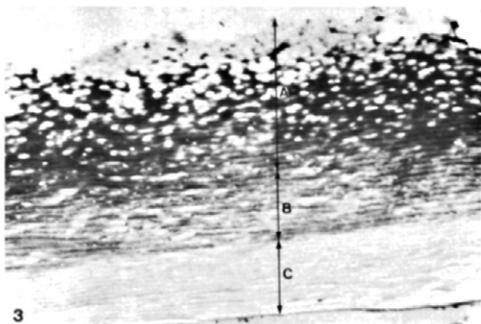


Fig. 3.—Sección transversal del pupario a nivel 1, cerca de la línea de apertura, mostrando la capa externa (A), la capa intermedia (B) y la capa interna (C). X 6.400.

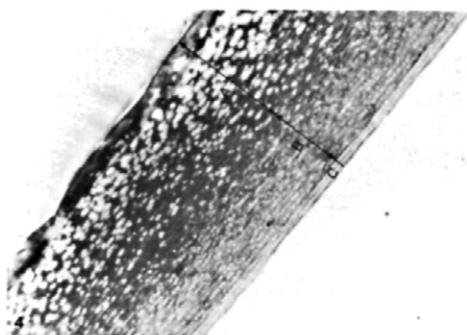


Fig. 4.—Sección transversal del pupario a nivel 2, correspondiente a la zona media, mostrando las mismas tres capas que en el nivel 1. Notar la diferencia de grosor con respecto al nivel 1, A=capa externa; B=capa intermedia; C=capa interna. X 6.400.

aparecer una cierta ordenación o estructuración en bandas claro-oscuras, pudiendo todavía apreciarse gran cantidad de cavidades, las cuales van disminuyendo a medida que aumenta la ordenación en bandas. Así mismo, la densidad electrónica también disminuye conforme nos acercamos a la tercera y última capa C. El grosor de la capa intermedia B es, aproximadamente, de  $2,8 \mu\text{m}$ .

En la capa interna C, la densidad electrónica ha disminuido notablemente respecto a la capa B, como así mismo el número de cavidades. Esta capa interna C es la que presenta una más clara estructuración en bandas, observándose perfectamente la existencia de bandas claras, delimitadas por otras oscuras considerablemente más delgadas. Esta capa interna C se encuentra limitada en su parte inferior por una membrana perfectamente definida. El grosor de la capa interna C es, aproximadamente,  $2,8 \mu\text{m}$ .

El grosor de la pared del pupario en el nivel 1, es, aproximadamente, de  $11,3 \mu\text{m}$ .

La pared del pupario en el nivel 2 (fig. 4), corresponde a su parte media y está constituido por las mismas tres capas descritas en el nivel 1, si bien la zona más periférica de la capa externa A, muestra una membrana limitante bien definida y marcadamente electrón-densa. El espesor de las tres capas en el nivel 2, ha variado notablemente con respecto al nivel 1, siendo sobre todo, en la capa más interna C,

donde se aprecia una considerable disminución de grosor. El espesor total de las tres capas en el nivel 2, se encuentra disminuido en un 25%, aproximadamente, en comparación con el nivel 1. Este espesor es, aproximadamente, de 8,5  $\mu\text{m}$ .

La pared del pupario en el nivel 3, próximo al casquete inferior, posee una estructura equivalente al nivel 1 descrito anteriormente.

Con relación a la supervivencia-emergencia del adulto, pudo comprobarse como el número de nacimientos fue del 100% en todos y cada uno de los cuatro lotes estudiados. Así pues, sería interesante llevar a cabo en un futuro, estudios encaminados a determinar la actividad reproductora de estos individuos, después de sometidos al tratamiento, con la finalidad de obtener parámetros que correspondan a las tasas de fecundidad, fertilidad y longevidad de parejas aisladas.

## DISCUSION

El pupario de *Ceratitis capitata* a MEB, presenta una serie de características morfológicas que coinciden, en general, con las descritas por RUIZ-CASTRO (1945). Sólo con relación al tamaño del pupario, nuestros resultados muestran pequeñas diferencias con los de este autor. Así, RUIZ-CASTRO (1945) presenta dimensiones del pupario que oscilan entre 4,65 y 4,72 mm. de longitud y 2,12 y 2,32 mm. de anchura, mientras que en *Ceratitis capitata* no hemos observado la existencia de puparios que sobrepasaran los 4,2 y 2,1 mm. de longitud y anchura, respectivamente. MUÑIZ, GIL (1984) encontraron pupas de *Ceratitis capitata* con valores medios máximos de 4,78 mm. de largo y 2,17 mm. de ancho, pupas éstas que procedían de hembras de 21 días de edad. Así pues, parece lógico pensar que el tamaño de la pupa pueda estar influenciado por la edad de la generación parental.

El pupario de *Ceratitis capitata*, en comparación con el de *Dacus oleae* muestra una forma más achatada y un tamaño ligeramente menor, resultados éstos que están en consonancia con los obtenidos por RUIZ-CASTRO (1948), si bien este autor admite la posibilidad de que las dimensiones del pu-

pario de *Dacus oleae* varíen, disminuyendo notablemente si las larvas son separadas del fruto antes de alcanzar su completo desarrollo, no llegando a tener, en este último caso, una longitud mayor de 3,5 mm.

Los estudios comparativos entre diversas ultraestructuras del pupario de otros insectos, con el de *Ceratitis capitata*, ha presentado el inconveniente de la escasez de datos bibliográficos, lo que ha impedido poder establecer la lógica correlación de resultados.

Consideramos interesante destacar las características ultraestructurales de las tres capas constituyentes del pupario de *Ceratitis capitata* y la relación que pueda existir entre cada una de ellas y el grado de protección que confieren a la ninfa.

La ultraestructura esponjosa que puede observarse en la capa externa A e intermedia B, presenta diversos grados de intensidad. De esta forma, consideramos posible que, en función de esta esponjosidad, el grado de penetración de cualquier sustancia sea distinto, según se trate de la capa externa, intermedia o interna. En el caso concreto de la acción del tetróxido de osmio, se ha podido comprobar cómo su acción fijadora se muestra intensa en las capas externa A e intermedia B, pero notablemente disminuida en la capa interna C, lo que justifica la distinta densidad electrónica que se observa entre ellas. Esto puede ser achacable a la propia acción fijadora del tetróxido de osmio, que al ser más intensa en las capas más externas, dificulta por sí misma la penetración del fijador hacia las capas más profundas. Esta podría ser una de las explicaciones por las cuales el tetróxido de osmio no ha sido capaz de atravesar, con la misma intensidad, la capa interna C, y de esta forma, la ninfa ha permanecido intacta produciéndose la total emergencia de los adultos. En cualquier caso, la existencia de la capa interna C, por su carencia absoluta de cavidades y peculiar estructura, dificulta por sí misma de forma natural la penetración de cualquier agente externo.

Por otro lado, parece deducirse de las diferencias de grosor observadas en la pared del pupario, a nivel de los casquetes polares (niveles 1 y 3) y a nivel de la zona media (nivel 2), que la mayor protección a la ninfa

tiene lugar donde existe un mayor grosor del pupario, es decir, en los niveles 1 y 3, que son precisamente los correspondientes a la región cefálica y al órgano ovipositor.

En resumen, puede deducirse que la pared del pupario presenta una ultraestructura capaz de ofrecer un alto grado de protección a la

ninfa, lo que confiere a esta fase del desarrollo embrionario una gran resistencia frente a los agentes agresivos externos, lo cual estaría en consonancia con el hecho de que la emergencia de los adultos tiene lugar en el 100% de las pupas que fueron sumergidas en la solución de tetróxido de osmio.

#### ABSTRACT

MAYO, A.; GARRIDO, A.; MUÑIZ, M.; ROBLES-CHILLIDA, E. M. (1989): Ultraestructura del pupario de *Ceratitís capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 15 (2): 143-148.

It has been described the puparium morphology of *Ceratitís capitata* (Diptera: Tephritidae) by means of scanning and transmission electron microscopes.

The puparium is constituted by three strata with different morphology and different electron density: Outer stratum A, intermediate stratum B and inner stratum C. Stratum A shows a peripheral zone, extremely electron-pale, with several cavities more or less spherical, whereas the inner zone is considerably more electron-dense. Stratum B shows an intermediate morphology between stratum A and stratum C. Inner stratum C, with a lower electron density, shows a pseudo-crystalline structure and it lacks cavities.

The strata morphology of the puparium is discussed with respect to the protection which confers to the nymph, and with respect to the penetrability of external agents.

**Key words:** *Ceratitís capitata*, puparium, ultrastructure.

#### REFERENCIAS

- ARMSTRONG, J. W. y COUEY, H. M. (1984): Methyl bromide fumigation treatments at 30° C for California stonefruit infested with the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 77: 1229-1232.
- DALLAI, R.; MARCHINI, D.; CALLAINI, G.; FANCIULLI, P. P.; DEL BENE, G. y MELIS-PORCINAI, G. (1986): The egg structure of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitís capitata* (Diptera: Tephritidae). *Redia*, 69: 313-328.
- FERON, M. (1962): L'instinct de reproduction chez la Mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitís capitata* Wied. (Diptera: Trypetidae). Comportement sexuel. Comportement de ponte. *Rev. Path. veg. Ent. agr. Fr.*, 41: 88-89.
- FERON, M. (1965): Mediterranean fruit flies and related species: Laboratory studies in France. En: *Advances in insect population control by the sterile-male technique*. Ed. Int. At. Energy Agency, Vienna, 21-22 pp.
- FITT, G. P. (1981): Inter and intraspecific responses to sex pheromones in laboratory bioassays by females of three species of Tephritid fruit flies from Northern Australia. *Ent. exp. appl.*, 30: 40-44.
- KOREN, B.; YAWETZ, A. y PERRY, A. S. (1984): Biochemical properties characterizing the development to tolerance to malathion in *Ceratitís capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 77: 864-867.
- MAYO, I.; ANDERSON, M.; BURGUETE, J. y ROBLES-CHILLIDA, E. M. (1987): Structure of superficial chemoreceptive sensilla on the third antennal segment of *Ceratitís capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.*, 16: 131-141.
- MELLADO, L. (1970): Aplicación práctica del método de lucha autocida contra *Ceratitís capitata*. Ensayos en frutales realizados por el I.N.I.A. (1966-1969). *Ania*, 209: 505-506.
- MELLADO, L.; CABALLERO, R.; ARROYO, M. y JIMÉNEZ, A. (1966): Ensayos sobre erradicación de *Ceratitís capitata* Wied. por el método de machos estériles en la isla de Tenerife. *Bol. Patol. veg. Ent. agric.*, 29: 89-117.
- MELLADO, L.; ARROYO, M. y ROS, J. P. (1974): Control of *Ceratitís capitata* Wied. by the sterile male in Spain. En: *The sterile-insect technique and its field applications*. Ed. STI/PUB/364, IAEA, Vienna.
- MUÑIZ, M. (1973): Influencia de la presión osmótica en la eclosión de los huevos de *Dacus oleae* y *Ceratitís capitata*. *Bol. R. Soc. esp. Hist. Nat. (Biol.)*, 71: 155-166.
- MUÑIZ, M. (1976): Influencia de la actividad química

- de electrolitos en la eclosión de los huevos de *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Trypetidae). *An. INIA Serv. Prot. Veg.*, **6**: 67-87.
- MUÑIZ, M. (1977): Técnica para la evaluación de puesta en *Ceratitis capitata* Wied., 1824 (Diptera: Trypetidae). *Graellsia*, **31**: 277-292.
- MUÑIZ, M. (1980): Acción del formaldehído sobre sucesivas generaciones de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Trypetidae). *Graellsia*, **34**: 223-235.
- MUÑIZ, M. y GIL, A. (1984): Desarrollo y reproducción de *Ceratitis capitata* (Wied.) en condiciones artificiales. *Bol. Serv. Plagas*, **2**: 1-139.
- MUÑIZ, M. y MORA, R. (1981): Fecundidad y fertilidad de puesta en *Ceratitis capitata* Wied. 1824 (Diptera: Trypetidae) bajo la acción de dosis de radiación gamma. *Graellsia*, **35**: 129-141.
- MUÑIZ, M. Y REY, J. M. (1979): Comportamiento de *Ceratitis capitata* (Wied.) ante el tratamiento con formaldehído en la dieta larvaria (Diptera: Trypetidae). *Graellsia*, **33**: 279-308.
- OHINATA, K.; FUJIMOTO, M. S.; CHAMBERS, D. L.; JACOBSON, M. y KAMAKAHI, D. C. (1973): Mediterranean fruit fly: Bioassay techniques for investigating sex pheromones. *J. Econ. Entomol.*, **66**: 812-814.
- OHINATA, K.; JACOBSON, M.; NAKAGAWA, S.; FUJIMOTO, M. e HIGA, H. (1977): Mediterranean fruit fly: Laboratory and field evaluations of synthetic sex pheromones. *J. Environ. Sci. Health A.*, **12**: 67-68.
- PROKOPY, R. J.; ZIEGLER, J. R. y WONG, T. T. Y. (1978): Deterrence of repeated oviposition by fruit-marking pheromone in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *J. Chem. Ecol.*, **4**: 55-63.
- RICE, R. E.; CUNNINGHAM, R. T. y LEONHARDT, B. A. (1984): Weathering and efficacy of trimedlure dispensed for attraction of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, **77**: 750-756.
- ROBLES-CHILLIDA, E. M. (1975): Contribución al estudio micromorfológico del huevo y la larva de *Ceratitis capitata* (Wied., 1824). *Graellsia*, **29**: 211-224.
- ROTHERAY, G. E. (1986): The larva and puparium of *Epistrophe grossulariae* Meigen (Dipt., Syrphidae) with a note on overwintering behaviour. *Entomol. Month. Mag.*, **122**: 215-218.
- RUIZ-CASTRO, A. (1945): Fauna entomológica de la vid en España. Estudio sistemático-biológico de las especies de mayor importancia económica. Vol. III (Diptera). *Trab. Inst. Esp. Entomol.*, CSIC, Madrid.
- RUIZ-CASTRO, A. (1984): Fauna entomológica del olivo en España. Estudio sistemático-biológico de las especies de mayor importancia. Vol. II (Generalidades, Coleoptera y Diptera). *Trab. Inst. Esp. Entomol.*, CSIC, Madrid.
- SKIDMORE, P. (1986): The puparium of *Buccocephala subcostalis* Emdem. (Dipt., Muscidae). *Entomol. Month. Mag.* **122**: 211-214.
- ZÚMREOGLU, A. (1983): Field cage evaluations of the male sex pheromone (Methyl (E)-6-nonenolate) of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. En: *Fruit flies of economic importance*. Ed. R. Cavalloro. A.A. Balkema/Rotterdam, 1982, 495-499 pp.

(Aceptado para su publicación: 27 enero 1989)