



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Caracterización genética de los cromosomas sexuales de *Anastrepha fraterculus* sp. 1

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

María Cecilia Giardini

Director de Tesis: Dra. Mariela Nieves

Director Asistente: Dra. Silvia B. Lanzavecchia

Consejero de Estudios: Dra. Marta D. Mudry

Lugar de trabajo: - Laboratorio de Insectos de Importancia Agronómica, Instituto de Genética "Ewald A. Favret", CICVyA, INTA; gv IABIMO-CONICET.

- Grupo de Investigación en Biología Evolutiva, EGE, IEGEBA, CONICET-UBA, FCEyN-UBA.

Buenos Aires, 2022

Caracterización genética de los cromosomas sexuales de *Anastrepha fraterculus* sp. 1

Anastrepha fraterculus es una plaga de frutales de importancia económica en varios países de Sudamérica. Es actualmente reconocida como un complejo de especies crípticas y, particularmente en nuestro país, se ha descrito la presencia de un solo morfotipo (sp. 1) hasta el momento. Estudios citogenéticos previos en esta especie describieron variación de tamaño y patrones de tinción en sus cromosomas sexuales. Esta tesis tiene como objetivo general realizar un análisis exhaustivo del cariotipo mitótico y el complemento politénico de *A. fraterculus* sp. 1. Los ensayos planificados incluyeron el estudio de la composición y distribución de la heterocromatina, el mapeo de los genes ribosomales y el análisis comparativo de las variantes de cromosomas sexuales encontradas. Asimismo, se desarrolló un análisis poblacional de las variantes cromosómicas (cariomorfos) de *A. fraterculus* sp. 1, en cinco poblaciones silvestres de las principales áreas frutícolas de Argentina. Este estudio proporcionó información actualizada sobre la frecuencia y distribución geográfica de los cariomorfos descritos hasta el momento y permitió su comparación con cuatro líneas de laboratorio. A partir de estos resultados se postularon diferentes hipótesis sobre el origen de los polimorfismos hallados, destacando la importancia del uso de la citogenética para comprender posibles rutas de invasión y dispersión de esta plaga en Argentina. Las deducciones realizadas también permitieron interpretar el efecto de las fuerzas evolutivas que pudieron impulsar los cambios estructurales reflejados en la heterocromatina y en las frecuencias cromosómicas. En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral brindan información relevante sobre la biología y la genética del morfotipo *A. fraterculus* sp. 1 en nuestro país. Específicamente se aportan herramientas citológicas para la caracterización y selección de líneas de insectos para contribuir con la implementación de técnicas de control sustentables contra esta plaga.

Palabras clave: Cromosomas sexuales, variantes cariotípicas, distribución geográfica, patrones de dispersión, técnica del insecto estéril.

Genetic characterization of the *Anastrepha fraterculus* sp. 1 sex chromosomes

Anastrepha fraterculus is an economically important pest of fruit in several South American countries. It is currently recognized as a complex of cryptic species and, particularly in Argentina, only one morphotype (sp. 1) has been detected so far. Previous cytogenetic studies have been described variations in size and staining patterns of sex chromosomes in this species. The goal of this thesis was to carry out an exhaustive analysis of the mitotic and polytene chromosomes of *A. fraterculus* sp. 1. The experiments included the study of the composition and distribution of the heterochromatin, the mapping of ribosomal genes, and the comparative analysis of sex chromosomes variants. A population analysis was also planned to study the chromosome variants (karyomorphs) in *A. fraterculus* sp. 1, in five wild populations of the main fruit-producing areas of Argentina. This study has provided updated information on the frequency and geographic distribution of the karyomorphs described so far and made it possible to compare them with four laboratory lines. From these results, several hypotheses on the origin of the polymorphisms detected have been raised, highlighting the use of the cytogenetics to understand possible routes of invasion and dispersal of this pest species in our country. The deductions made also allowed us to interpret the effects of the evolutionary forces that potentially have driven changes in chromosomal frequencies and structural modifications reflected in the heterochromatin. The results obtained in this PhD Thesis provide valuable information about the biology and genetics of the *A. fraterculus* sp. 1 morphotype in Argentina. In particular, the findings bring cytological tools useful to the characterization and selection of insect strains to contribute with the implementation of sustainable control techniques against this pest.

Key words: Sex chromosomes, karyotypic variants, geographic distribution, dispersal patterns, sterile insect technique.

A todos los que me acompañaron en este camino...

A Delfina y a Joaquín

Abreviaturas

a: acrocéntrico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNr: ADN ribosomal

N-terminal: amino terminal

AFLP: *Amplified fragment length polymorphism*. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosomal

AT: Adenina-Timina

Ba (OH)₂: Hidróxido de bario

C-terminal: carboxi terminal

C: centrómero

CaCl: Cloruro de calcio

Cf: Concentración final

c/n: cantidad necesaria

CGH: Comparative genomic hybridization. Hibridación genómica comparada

CMA₃: Cromomicina A₃

csd: *complementary sex determiner*. Determinante sexual complementario

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DOP-PCR: Degenerate oligonucleotide- primed polymerase chain reaction. Reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos degenerados.

dsx: gen doublesex

2n: Número somático

ETOH 100%: Etanol absoluto

ETOH: etanol

FISH: Fluorescence *in situ* hybridization. Hibridación *in situ* fluorescente

FITC: Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5- isotiocianato

GC: Guanina-Citocina

GISH: Genomic *in situ* hybridization. Hibridación *in situ* genómica

°C: grados centígrados

H: Huevos

H₂O destilada: Agua destilada

HCl: Ácido clorhídrico

hn: Heterochromatic network. Red granular heterocromática

HP: supervivencia huevo-pupa

HPLC: High-pressure liquid chromatography. Cromatografía líquida de alta presión

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium. Equilibrio de Hardy-Weinberg

IC: Índice centromérico

IGS: Intergenic spacer. Espaciador intergénico

lp: índice de pureza

ISH: In situ hybridization. Hibridación in situ

ITS: Internal transcribed spacer. Secuencia transcrita espaciadora interna

KCl: Cloruro de potasio

±: más, menos

m: metacéntrico

M: Molar

μM: micromolar

mM: milimolar

μg/ml: microgramos por mililitro

mg/ml: miligramos por mililitro

N: Normal

NaAcO: Acetato de sodio

NaCl: Cloruro de sodio

NaHCO₃: Carbonato de sodio

NH₄AcO: Acetato de amonio

ng/μl: nanogramos por microlitro

nm: nanómetros

N: Norte

NOR: Nucleolar organizer region. Región organizadora nucleolar

NT: Nick Translation

NTS: Nontranscribed spacer. Espaciador no transcrito

ON: Overnight. Toda la noche

ORF: Open Reading frame. Marco abierto de lectura

pb: par de bases

%_e: porcentaje de emergencia del adulto

p/v: Peso en volumen

rpm: revoluciones por minuto

S: Sur

sc.: Solución

sp.: Especie

sm: submetacéntrico

sx/: gen sex-lethal

TA: Temperatura ambiente

TIE: Técnica del Insecto Estéril

tra: gen transformer

u: unidades

u/ μ l: unidades por microlitro

v/v: Volumen en volumen

Índice

Abreviaturas	5
Nota del tesista.....	11
Organización de la Tesis	12
IG: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
IG1 ¿Quién es <i>Anastrepha fraterculus</i> ?	13
IG2 ¿Cuál es el principal interrogante con respecto a <i>A. fraterculus</i> ?	15
IG3 ¿Cómo se controla la plaga en Argentina?	17
IG4 <i>Anastrepha fraterculus</i> sp. 1 como objeto de estudios citológicos.....	18
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	19
CAPÍTULO 1: Caracterización del cariotipo mitótico y el complemento politénico de <i>A. fraterculus</i> sp. 1 de Argentina.....	21
I1: INTRODUCCIÓN.....	21
I1.1 Cromosomas, citogenética y cariotipo.....	21
I1.2 Citogenética clásica y molecular	23
I1.3 Heterocromatina y genes ribosomales	24
I1.4 Los cromosomas politénicos	25
I1.5 Aplicación de las técnicas de citogenética en insectos	27
OBJETIVOS - Capítulo 1.....	29
MM1: MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
MM1.1: Objetivo 1.1- Estudio de cromosomas mitóticos	30
MM1.2: Objetivo 1.2- Estudio de cromosomas politénicos.....	32
MM1.3: Objetivo 1.3 - Citogenética molecular: FISH en cromosomas mitóticos y politénicos de <i>A. fraterculus</i> sp. 1	33
R1: RESULTADOS	38
R1.1: ANÁLISIS EN CROMOSOMAS MITÓTICOS	38
R1.2: ANÁLISIS EN CROMOSOMAS POLITÉNICOS	42
R1.3: FISH EN CROMOSOMAS MITÓTICOS Y POLITÉNICOS	47
D1: DISCUSIÓN	51
D1.1 El Cariotipo mitótico de <i>Anastrepha fraterculus</i> sp. 1.....	51
D1.2 El complemento politénico de <i>Anastrepha fraterculus</i> sp. 1	53
D1.3 Caracterización de los cromosomas mitóticos y politénicos de <i>Anastrepha fraterculus</i> sp. 1 mediante FISH.....	53

CAPÍTULO 2: Frecuencia y distribución geográfica de las variantes de cromosomas sexuales identificadas en Argentina. Caracterización molecular del cromosoma Y de <i>A. fraterculus</i> sp. 1.	57
.....	57
I2: INTRODUCCIÓN.....	57
I2.1 Estudios citológicos-poblacionales en insectos.....	57
I2.2 Reproducción sexual, cromosomas sexuales y determinación del sexo.....	58
I2.3 Mecanismos de determinación del sexo en insectos.....	59
I2.4 Los genes de la cascada de determinación sexual en insectos tefrítidos	61
I2.5 Estrategias para el estudio de la organización genética de los cromosomas	63
OBJETIVOS - Capítulo 2.....	64
MM2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
MM2.1: Objetivo 2.1- Generación y mantenimiento de la línea Af-Y chico	65
MM2.2: Objetivo 2.2- Material biológico y estudios poblacionales	65
MM2.3: Objetivo 2.3- Microdissección del cromosoma Y ₅	68
MM2.4: Objetivo 2.4- Detección de regiones sexo específicas en <i>A. fraterculus</i> sp. 1 mediante AFLP	70
R2: RESULTADOS	75
R2.1: GENERACIÓN DE LA LÍNEA Af- Y chico	75
R2.2: FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS VARIANTES DE CROMOSOMAS SEXUALES IDENTIFICADAS.....	76
R2.3: MICRODISECCIÓN CROMOSÓMICA	82
R2.4: ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO MOLECULAR ENTRE MACHOS Y HEMBRAS	83
D2: DISCUSIÓN	89
D2.1 Generación de la línea Af-Y chico	89
D2.2 Caracterización de los cromosomas sexuales de <i>A. fraterculus</i> sp. 1 - Análisis Poblacionales	90
D2.3 Microdissección del cromosoma Y ₅	93
D2.4 AFLPs en <i>A. fraterculus</i> sp. 1	94
CAPÍTULO 3: Composición molecular de los cromosomas sexuales de <i>A. fraterculus</i> sp. 1 de Argentina	97
.....	97
I3: INTRODUCCIÓN.....	97
OBJETIVO - Capítulo 3	101
MM3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	102
R3: COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES.....	105
D3: DISCUSIÓN	110
DG: DISCUSIÓN GENERAL	112

CG: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	121
Anexo de Figuras y Tablas	122
Bibliografía.....	128

Nota del tesista

Los cromosomas son, a mi criterio, las estructuras más fascinantes que podemos encontrar dentro de las células de todos los organismos vivos. Todavía recuerdo la primera vez que vi un cromosoma al microscopio...fue en una clase de botánica donde estábamos estudiando la meiosis de *Allium cepa*. Desde aquél día supe que quería estudiarlos.

Años más tarde, en el primer congreso de genética al que asistí, conocí a Jorge y a Fanny, quienes dirigían el laboratorio de moscas del Instituto de Genética del INTA de Castelar. Comencé a trabajar allí meses más tarde haciendo una pasantía. Producto de esa pasantía realicé mi tesina de licenciatura, estudiando los reordenamientos cromosómicos espontáneos e inducidos en una colonia de laboratorio de *Anastrepha fraterculus* (mosca sudamericana de la fruta). Siempre profundizando en los estudios citogenéticos de esta plaga, comencé a plantearme el tema de mi Tesis Doctoral. Para estudiar más exhaustivamente los cromosomas de *Anastrepha*, debía explorar su composición molecular. Tal es así que, a mi directora Mariela, la conocí cuando dictó un curso de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) en la Universidad de San Martín, donde también incursionamos en la microdissección de cromosomas y a mi co-directora Silvia, en mi laboratorio, como experta en biología molecular de moscas.

Anastrepha fraterculus es una plaga de frutales de América del Sur y es por su distribución, creo yo, que no ha sido tan explorada como *Ceratitis capitata*, que se encuentra distribuida en forma mundial. Igualmente, previo al planteo de mi Tesis, existían estudios en *Anastrepha* realizados por mi grupo de trabajo y por otros grupos del país y de Brasil. Todos estos estudios se detallan a lo largo del manuscrito.

Este trabajo de Tesis, tiene como objetivo implícito a futuro, explorar regiones cromosómicas y, si es posible, identificar el/los factores determinantes de la masculinidad en *A. fraterculus*. A lo largo de este trabajo, pretendo mostrar los avances logrados en ese sentido, describir los estudios realizados y discutir los resultados alcanzados y las perspectivas hacia un mayor conocimiento citogenético de la especie bajo estudio.

Organización de la Tesis

A fin de brindar una lectura amena y permitir el seguimiento de un hilo conductor fiel a la cronología y a la estructura con la cual se desarrolló el trabajo de Tesis Doctoral, se organizó el manuscrito de la siguiente manera: una primera sección de Introducción General, seguida por tres capítulos que contienen una Introducción específica a cada tema y el desarrollo de Materiales y Métodos, Resultados y Discusión correspondientes a los objetivos específicos 1, 2 y 3, respectivamente. A continuación, la sección de Discusión General, seguida de Conclusiones Generales y Perspectivas. Al final de la Tesis se encuentra la lista de Bibliografía citada en orden alfabético y un anexo de Figuras y Tablas.

En el capítulo 1, se centró en la exploración y caracterización de los cromosomas mitóticos de *A. fraterculus* sp. 1, específicamente sus cromosomas sexuales que fueron los que “reaccionaron” a las diferentes tinciones de citogenética clásica utilizadas. Se realizó también un mapa detallado de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales y se estudiaron ambos tipos de cromosomas mediante FISH (*Fluorescence in situ hybridization*), con sonda del arreglo de genes ribosomales 18S. En el capítulo siguiente, se realizaron estudios poblacionales para analizar la frecuencia y distribución de las variantes de cromosomas sexuales que se hallaron tanto en poblaciones de laboratorio, como en poblaciones naturales de nuestro país. Para continuar con estos estudios citológicos, se fundó una línea de laboratorio, que porta la variante de cromosoma Y más pequeña y frecuentemente hallada en las poblaciones silvestres y de laboratorio estudiadas. También en este mismo capítulo, se realizaron experimentos de microdissección de cromosomas y de marcadores moleculares AFLP, con el objetivo de caracterizar a nivel de secuencias nucleotídicas, regiones cromosómicas relacionadas con el sexo. Como dichos resultados no resultaron positivos, se decidió estudiar la composición molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* utilizando GISH (*Genomic in situ hybridization*) y CGH (*Comparative genomic hybridization*). Estos experimentos de citogenética molecular son los que conforman el tercer capítulo de la Tesis.

Considero que los resultados alcanzados en el presente trabajo de Tesis Doctoral, permitieron confirmar la presencia, en Argentina, de un único morfotipo del complejo de especies al que pertenece *A. fraterculus* sp. 1, a la vez que se generaron herramientas necesarias para abordar el problema de la plaga y se hicieron aportes significativos a la citogenética de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus*, contribuyendo con conocimientos necesarios para plantear métodos de control amigables con el medio ambiente.

IG: INTRODUCCIÓN GENERAL

IG1 ¿Quién es *Anastrepha fraterculus*?

Anastrepha fraterculus Wiedemann (Diptera: Tephritidae), comúnmente conocida como “la mosca sudamericana de la fruta”, es una plaga de carácter cuarentenario que afecta a la producción frutícola de Argentina y otros países americanos. Esta especie es originaria de América y exhibe una amplia distribución geográfica en este continente. Los registros demuestran su presencia desde la latitud 27° N hasta 35° S (Stone, 1942; Hernández-Ortiz y Aluja, 1993; Norrbom et al., 1999; Steck, 1999; Norrbom, 2004; Zucchi, 2007, 2019). Infesta una amplia variedad de frutos hospedadores, incluyendo plantas nativas y exóticas o introducidas, silvestres y de alto valor comercial. Entre las especies vegetales comerciales comúnmente atacadas por *A. fraterculus*, en zonas templadas a subtropicales, se encuentran los cítricos (naranja, mandarina, pomelo) y frutos de carozo (ciruela, durazno), mientras que entre las silvestres se destacan la guayaba, falsa guayaba y ubajay (Norrbom, 2004; Zucchi, 2007, 2019). En la tabla 1, se muestran los frutos hospederos más frecuentes (Segura et al., 2006).

Tabla 1: Frutos hospederos más comunes de *A. fraterculus* sp. 1 en Argentina. Datos extraídos de Segura et al., 2006

Nombre común	Nombre científico	Familia	Origen
Naranja	<i>Citrus sinensis</i> (L.)	Rutaceae	Comercial
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Rutaceae	Comercial
Pomelo	<i>Citrus paradisi</i> L.	Rutaceae	Comercial
Ciruela	<i>Prunus insititia</i> L.	Rosaceae	Comercial
Durazno	<i>Prunus persica</i> L.	Rosaceae	Comercial
Guayaba	<i>Psidium guajaba</i> L.	Myrtaceae	Silvestre
Feijoa- Falsa guayaba	<i>Feijoa sellowiana</i> Berg	Myrtaceae	Silvestre
Ubajay	<i>Hexachlamys edulis</i> Berg	Myrtaceae	Silvestre

IG1.1 Ciclo de vida de *A. fraterculus*

Anastrepha fraterculus es un insecto holometábolo, realiza una metamorfosis completa, y posee cuatro etapas bien diferenciadas en su desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. Su ciclo de vida completo tiene una duración de alrededor de 26-28 días, desde el momento de la postura del huevo hasta la emergencia del adulto (Figura 1) (Dias y Lucky, 2017). En la naturaleza, las hembras de esta especie plaga, depositan los huevos en el interior de la fruta

utilizando sus ovipositores esclerotizados. Los huevos de *A. fraterculus* son de color blanco crema y miden entre 1,35 y 1,42 mm y es la etapa donde ocurre el desarrollo embrionario (Murillo y Jiron, 1994; Selivon et al., 1997). A las 48-72 h, los huevos eclosionan y comienza la etapa larval que ocurre completamente dentro de la fruta, y se diferencia en tres estadios (L1, L2 y L3), cada uno separado por una muda. Durante todo este período, la larva se alimenta de la pulpa de la fruta y aumenta su tamaño. Por lo general, el primer estadio ocurre de 1 a 3 días desde la eclosión del huevo, el segundo estadio de 4 a 6 días luego de la eclosión, el tercer estadio de 7 a 12 días posteriores a la eclosión (Nieuwenhove y Ovruski, 2011). La longitud corporal promedio del tercer estadio varía de 8,77 mm a 10,02 mm (Canal et al., 2015). A continuación, la larva de 3er. estadio salta del fruto y se entierra a unos escasos milímetros de la superficie del suelo.

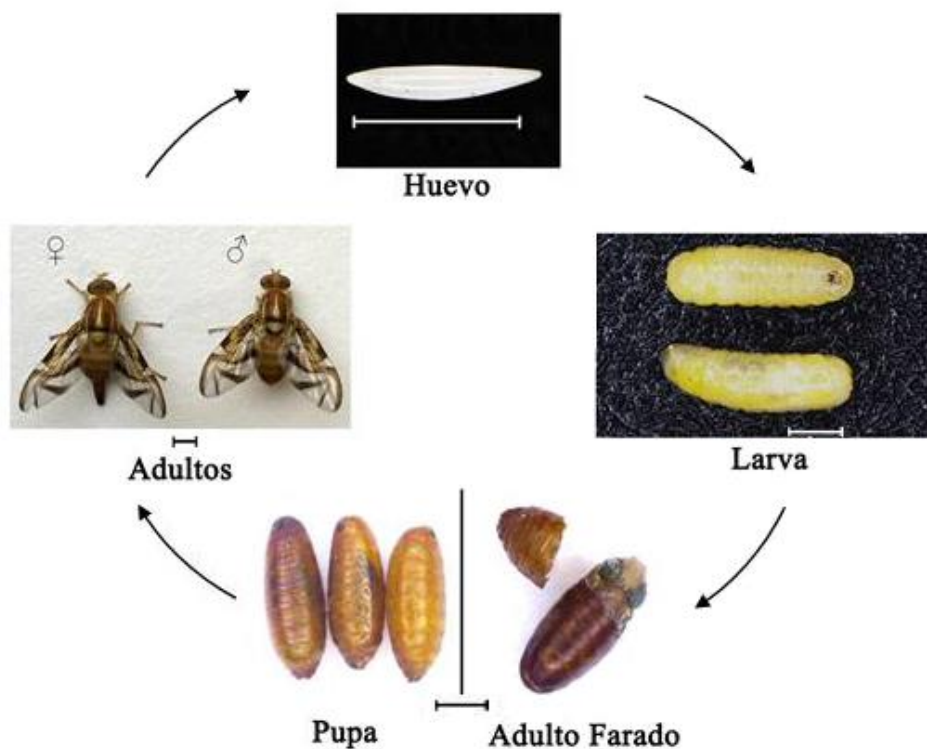


Figura 1: Ciclo de vida de *A. fraterculus*. Fotos extraídas de Dias y Lucky (2017). Las barras en cada uno de los estadios, corresponden a 1mm.

La etapa de pupa comienza luego de que la larva 3 abandona el fruto y busca refugio en el suelo y, se caracteriza por la inmovilización del individuo y la esclerotización de la cutícula (Wappner, 1995). Esta etapa dura entre dos y tres semanas, dependiendo fundamentalmente de las condiciones ambientales. En este estado ocurren importantes cambios estructurales y fisiológicos y una intensiva diferenciación celular (metamorfosis). Las pupas de *A. fraterculus* son cilíndricas y de color castaño, volviéndose más oscuras cuando el insecto está

completamente desarrollado. Al final de este estado, se encuentra un adulto farado (individuo con la morfología de la etapa adulta, aun dentro del pupario). Una vez culminada la metamorfosis emerge el adulto (Dias y Lucky, 2017).

En el estado adulto, los individuos son alados, su color es castaño amarillento, y su longitud varía de 12 a 14 mm. Aunque su tamaño es muy variable, el aspecto y morfología de su par de alas, genitalia (particularmente la femenina) y tórax constituyen caracteres diagnósticos para identificar a las especies y a los sexos (Hernández-Ortiz et al., 2004, 2012, 2015). El tamaño de las hembras suele ser mayor que el de los machos (Dias y Lucky, 2017). Dependiendo de las condiciones climáticas, el adulto posee una longevidad de tres a seis meses (Gonzalez et al., 1971; Salles, 1995; Sugayama et al., 1998; Dias y Lucky, 2017).

IG1.2 Comportamiento sexual

Una vez que los machos adultos maduran sexualmente (5-7 días post-emergencia), comienzan a manifestar un comportamiento sexual complejo que incluye la liberación de feromonas de llamado, señales acústicas, aumento del movimiento y exhibición de sus alas (Segura et al., 2007; Gomez Cendra et al., 2011; Břízová et al., 2013; Cladera et al., 2014; Dias et al., 2016; Dias y Lucky, 2017). En esta especie es característico el *lekking* o agrupamiento de machos. El *lek* se forma con 3 a 8 machos sexualmente maduros que se reúnen (generalmente en la cara inferior de las hojas de los árboles) para atraer, cortejar y aparearse con las hembras receptivas (Morgante et al., 1980; Segura et al., 2007; Cladera et al., 2014). Las hembras adquieren dicha receptividad al cabo de 10 a 12 días post-emergencia, cuando alcanzan su madurez sexual.

En general, en *A. fraterculus* sp. 1, la cópula ocurre temprano en la mañana, durante la primera hora y media luego del amanecer (7:30-9:00 h) (Petit-Marty et al., 2004). La temperatura y la luz solar afectan el apareamiento, sin registrarse cópulas en temperaturas inferiores a los 16°C (Malavasi et al., 1983; De Lima et al., 1994; Petit-Marty et al., 2004).

IG2 ¿Cuál es el principal interrogante con respecto a *A. fraterculus*?

El *status* taxonómico de *A. fraterculus* se encuentra en revisión. Actualmente es considerada como un complejo de especies crípticas, con al menos ocho morfotipos descritos (Steck, 1991; Hernández-Ortiz et al., 2004, 2012, 2015). Estudios previos muestran como probable centro de origen de este complejo, a la región norte de América del Sur (Brasil) (Selivon et al., 2005a; Hendrichs et al., 2015; Mengual et al., 2017). En la Figura 2, se muestra la localización geográfica de los morfotipos descritos hasta el momento (Prezotto et al., 2019).

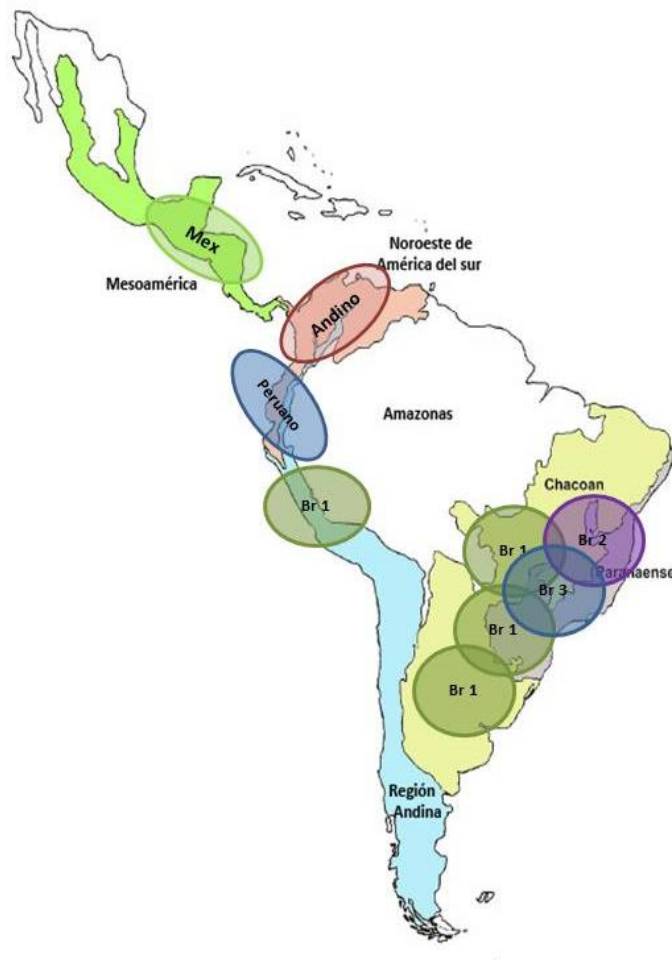


Figura 2: Localización geográfica de morfotipos de *A. fraterculus*. Extraído de Prezotto et al., 2019 y modificado. Mex= morfotipo mexicano, Andino= morfotipo Andino, Peruano= morfotipo Peruano (sp. 4), Br 1= morfotipo Brasil 1 (sp. 1), Br 2= morfotipo Brasil 2 (sp. 2) y Br 3= morfotipo Brasil 3 (sp. 3).

Para estudiar las diferencias entre los morfotipos encontrados, se han realizado estudios de morfometría (Hernández-Ortiz et al., 2004, 2012, 2015), análisis citogenéticos (Selivon et al., 2005a; Goday et al., 2006; Cáceres et al., 2009; Hendrichs et al., 2015; Vaníčková et al., 2015b; Dias et al., 2016; Mengual et al., 2017; Schutze et al., 2017; Zacharopoulou et al., 2017; Prezotto et al., 2019), estudios genético-poblacionales (Morgante et al., 1980; Steck y Sheppard, 1993; Alberti et al., 1999; 2002; Smith-Caldas et al., 2001; Selivon et al., 2005b; Selivon y Perondini, 2007; Ludueña, 2010; Sutton et al., 2015; Barr et al., 2017), estudios fisiológicos y de comportamiento (Vera et al., 2006; Cáceres et al., 2009; Segura et al., 2011; Rull et al., 2012, 2013; Devescovi et al., 2014; Dias et al., 2016, 2020) y análisis de la composición de feromonas e hidrocarburos de la cutícula (Cáceres et al., 2009; Břízová et al., 2015; Vaníčková et al., 2015a; Roriz et al., 2019). Asimismo, en los últimos años, los estudios taxonómicos integrales han propuesto una nueva perspectiva para estudiar a los miembros del complejo *A. fraterculus* contemplando enfoques multidisciplinarios (Cáceres et al., 2009;

Vaničková et al., 2015b; Dias et al., 2016; Schutze et al., 2017; Prezotto et al., 2019; Selivon et al., 2022).

En Argentina se ha descrito la presencia de una sola entidad del complejo *A. fraterculus*, formalmente denominada *Anastrepha fraterculus* sp. 1 o morfotipo brasileño 1 (Zucchi, 2000; Selivon et al., 2005a; Goday et al., 2006). Se ha registrado su presencia principalmente en las regiones noreste (Misiones, Corrientes, Chaco, Entre Ríos y Formosa) y noroeste (Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca y Santiago del Estero) y también en oasis cultivados de La Rioja, San Juan, Mendoza y San Luis. Asimismo, fue detectada en Córdoba y norte de la provincia de Buenos Aires (Segura et al., 2006; Ovruski et al., 2010; Funes et al., 2017). Existe una extensa bibliografía sobre aspectos biológicos y distribución geográfica de *A. fraterculus* sp. 1 en Argentina. Particularmente, se han realizado estudios ecológicos, comportamentales, fisiológicos, genético-moleculares (Cladera et al., 2014; Lanzavecchia et al., 2014; Manni et al., 2015; Rodriguez et al., 2019), estudios de citogenética clásica y molecular en cromosomas mitóticos y politénicos (Basso et al., 2003; Giardini et al., 2009; Giardini et al., 2015), ecología química (Bachmann et al., 2015, 2017, 2019), estudio de sus simbioses (Conte et al., 2019; Devescovi et al., 2019; Juárez et al., 2019; Salgueiro et al., 2020) y recientemente se han iniciado estudios genómicos en este morfotipo (Scannapieco et al., 2020).

IG3 ¿Cómo se controla la plaga en Argentina?

El control de la densidad poblacional de *A. fraterculus* en campos de producción de fruta está incluido en el manejo integrado de plagas, coordinado a nivel nacional y regional por el Programa Nacional de Control y Erradicación de Moscas de la Fruta (PROCEM, SENASA). Sin embargo, dada la falta de medidas específicas, el tratamiento contra esta plaga se basa fundamentalmente en el trapeo y la aplicación de químicos (Guillen y Sánchez, 2007; Cladera et al., 2014). En la actualidad se hallan en etapa de desarrollo algunos métodos de control de bajo impacto ambiental, como la Técnica del Insecto Estéril (TIE) (Knippling, 1955; Meza et al., 2020; Mastrangelo et al., 2021) y el control biológico mediante el uso de parasitoides (De Bach, 1964; Ovruski et al., 2003).

La TIE es un método de control de plagas de insectos, amigable con el medio ambiente. Implica la cría masiva de la especie plaga a controlar y su esterilización. Una vez esterilizados, se procede a la liberación de los insectos estériles en las zonas de prevalencia de la plaga. Esta técnica puede maximizar su eficacia si se cuenta con una línea de sexado genético que permita separar los sexos en etapas tempranas del desarrollo. De esa manera, la liberación solo incluiría a los machos estériles. Estos machos se aparean con hembras silvestres, transfiriendo a sus espermatecas espermatozoides estériles, impidiendo la fecundación de los huevos y la posibilidad

de dejar descendencia, con lo que se reduce la población de plaga en la siguiente generación (IAEA, 2020). Los aspectos relevantes para la implementación de la TIE para *A. fraterculus* incluyen entonces, el establecimiento de crías de nivel masivo y el estudio de su biología, particularmente de su comportamiento y genética (Cladera et al., 2014).

IG4 *Anastrepha fraterculus* sp. 1 como objeto de estudios citológicos

La complejidad genética y de comportamiento de esta especie plaga, las controversias respecto a su *status* taxonómico y la distribución geográfica de los morfotipos identificados, y los vacíos de conocimiento en el área de la biología reproductiva y de la determinación del sexo, evidencian la necesidad de un estudio exhaustivo de *A. fraterculus* sp. 1 en Argentina. Por estos motivos, en esta Tesis Doctoral se propone un abordaje citológico que incluye: la caracterización detallada del cariotipo mitótico, la organización y el análisis de sus cromosomas sexuales mediante la utilización de herramientas de citogenética clásica y molecular como la hibridación *in situ* fluorescente, hibridación *in situ* genómica e hibridación genómica comparada. Además, se incluye el estudio detallado del mapa de los cromosomas politénicos de la especie mediante técnicas de citogenética clásica y molecular. La información generada en esta Tesis será de utilidad para caracterizar las poblaciones silvestres y cepas de laboratorio de la especie, y para obtener un conocimiento genómico comparativo de sus cromosomas sexuales. Al mismo tiempo y mediante el análisis poblacional, se pretende brindar información relevante sobre posibles rutas de entrada al territorio argentino y proponer hipótesis sobre su dispersión y diversificación.

Se espera que la información generada, la puesta a punto de protocolos y los resultados presentados en esta Tesis Doctoral constituyan insumos de valor para desarrollar estrategias de manejo de crías en condiciones artificiales, necesarias para la implementación de la TIE contra esta plaga en nuestro país. Asimismo, se pretende que brinden conocimientos y herramientas para la dilucidación de especies dentro del complejo *A. fraterculus sensu stricto*.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Este proyecto plantea el estudio de aspectos genéticos en la mosca de la fruta *Anastrepha fraterculus* sp. 1, que posee en nuestro país el *status* de plaga cuarentenaria. Esta situación justifica la realización de estudios científicos que aporten información útil para el desarrollo de métodos de control de bajo impacto ambiental. En este sentido se propone realizar una caracterización citogenética y molecular detallada de los cromosomas sexuales y la localización de regiones específicas de sexo en *A. fraterculus* sp. 1, como así también, analizar la variabilidad cariotípica presente en poblaciones silvestres de esta especie en nuestro país.

Objetivos específicos

- 1- Caracterizar citológicamente el cariotipo mitótico y el complemento politénico de *A. fraterculus* sp. 1.
- 2- Estudiar la frecuencia y distribución geográfica de las variantes de cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 identificadas en Argentina. Aislar, y caracterizar a nivel de secuencia nucleotídica, regiones cromosómicas específicas de la variante más frecuente de cromosoma Y (Y₅).
- 3- Estudiar la composición molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1.

Hipótesis de trabajo

- 1- Los estudios citológicos de los cromosomas mitóticos y politénicos permiten caracterizar la variabilidad genética presente en las poblaciones argentinas del morfotipo *A. fraterculus* sp. 1.
- 2- Las poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1 exhiben mayor número de variantes morfológicas de cromosomas sexuales que las poblaciones de laboratorio.
- 3- El cromosoma Y de *A. fraterculus* sp. 1 porta regiones específicas que están ausentes en las hembras de la misma especie, las cuales están involucradas en la determinación del sexo.
- 4- Mediante la hibridación genómica comparativa resulta posible explorar la composición molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1.

CAPÍTULO 1

Caracterización del cariotipo mitótico y el complemento
politénico de *A. fraterculus* sp. 1 de Argentina

CAPÍTULO 1: Caracterización del cariotipo mitótico y el complemento politénico de *A. fraterculus* sp. 1 de Argentina

I1: INTRODUCCIÓN

I1.1 Cromosomas, citogenética y cariotipo

Los cromosomas son los componentes básicos del núcleo de una célula. Cada uno de ellos está compuesto por proteínas y una única molécula de ADN y, en su conjunto, portan el material genético hereditario completo de un organismo. El término "cromosoma" originalmente deriva del griego que significa cromo (color) y soma (cuerpo), debido a su intensa tinción con algunos colorantes. En eucariotas, el número diploide de cromosomas presentes en las células somáticas varía entre los diferentes grupos taxonómicos. Los seres humanos, por ejemplo, tienen un número diploide de 46 cromosomas con 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (X e Y). Por el contrario, los procariotas como las bacterias y las arqueas tienen un solo cromosoma circular organizado como un nucleóide en la célula (Balajee y Hande, 2018).

Los cromosomas están formados por cromatina que resulta de la interacción del ADN con las proteínas histónicas, no histónicas y ARN. La cromatina compone los núcleos de las células y puede presentar distintos grados de empaquetamiento o contracción distinguiéndose dos tipos citológicos: la eucromatina y heterocromatina (Alberts et al., 2002).

La eucromatina representa una gran proporción del genoma. En este estado, el ADN presenta flexibilidad en cuanto a los procesos moleculares que pueden ocurrir, los genes pueden activarse o inactivarse y el ADN puede descondensarse para su reparación o replicación.

Por su parte, la heterocromatina se encuentra en diferentes proporciones en el núcleo celular dependiendo de la especie, y puede estar involucrada en procesos celulares clave, como la protección de los extremos cromosómicos y la segregación de los cromosomas durante la mitosis, por ejemplo (Kouzarides, 2007). A nivel citológico, se encuentra distribuida en los genomas de manera especie-específica. En los eucariotas superiores, los centrómeros y telómeros generalmente contienen heterocromatina y, el ADN que la compone es usualmente de tipo repetitivo. Cuando se analiza el patrón de bandas C, que muestra la localización de la heterocromatina en el cariotipo, ésta puede ser observada, por ejemplo, en la región centromérica y pericentromérica de un amplio número de taxones animales como roedores, anfibios, e insectos. Se la puede encontrar también, en la región telomérica de las cebras de Hartmann, a lo largo de un brazo en algunos cromosomas de primates no humanos, en el cromosoma Y de los humanos, en el cromosoma X inactivo de las hembras de mamífero y en

los cromosomas 4 e Y de *Drosophila melanogaster* (Eissenberg y Elgin, 2000; Park y Kuroda, 2001; Redi et al., 2001).

En un sentido amplio, el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas, constituye la citogenética. Históricamente, esta área del conocimiento ha sido descrita como un campo híbrido de la ciencia que abarca a la citología y a la genética. Desde el descubrimiento de los cromosomas como vehículos hereditarios, se desarrollaron numerosas técnicas que permiten su visualización y análisis (Balajee y Hande, 2018).

En citogenética, se describe al cariotipo como la constitución cromosómica de una especie en cuanto al número, morfología, tamaño y patrón de bandas de los cromosomas que lo componen (King, 2006; Wu y Qin, 2019). Los estudios del cariotipo permiten explorar aspectos destacables y diagnósticos de las especies, como por ejemplo estimar la diversidad biológica, analizar reordenamientos cromosómicos, evidenciar la relación taxonómica entre especies e incluso, realizar inferencias sobre eventos evolutivos pasados (Delaunay, 1922; Dobigny et al., 2004; Cioffi et al., 2012). Habitualmente para el análisis del cariotipo, los cromosomas se estudian en metafase mitótica, porque en esta etapa del ciclo celular, se puede observar el complemento cromosómico completo de la especie en su mayor grado de compactación. Es en este momento donde además de caracterizar el número cromosómico, también se puede caracterizar su morfología y su composición en cuanto a cantidad de pares de cromosomas, presencia de regiones organizadoras nucleolares (NORs), nudos cromosómicos (Knobs; en el caso de las plantas) y constricciones secundarias. Según la posición donde se encuentra el centrómero, se pueden definir diferentes morfologías cromosómicas (Figura 3). Los cromosomas metacéntricos tienen el centrómero en la mitad del mismo y los cromosomas acrocéntricos tienen su centrómero cerca de uno de los extremos. Se denomina sub-metacéntrico, al cromosoma que posee su centrómero más cerca de la mitad del cromosoma que del extremo y sub-acrocéntrico cuando el centrómero está más cerca del final del cromosoma que de su parte media. Los cromosomas telocéntricos, se definieron originalmente, como un cromosoma con su centrómero estrictamente terminal (Levan et al., 1964; Sumner, 2003; 2008).

El número básico de cromosomas en las células somáticas de un individuo o una especie se denomina número somático y se designa como $2n$. Entonces, en los organismos diploides que carecen de alteraciones numéricas y/o estructurales, los cromosomas autosómicos están presentes en dos copias; pudiendo distinguirse morfológicamente o no, sus cromosomas sexuales (White, 1973).

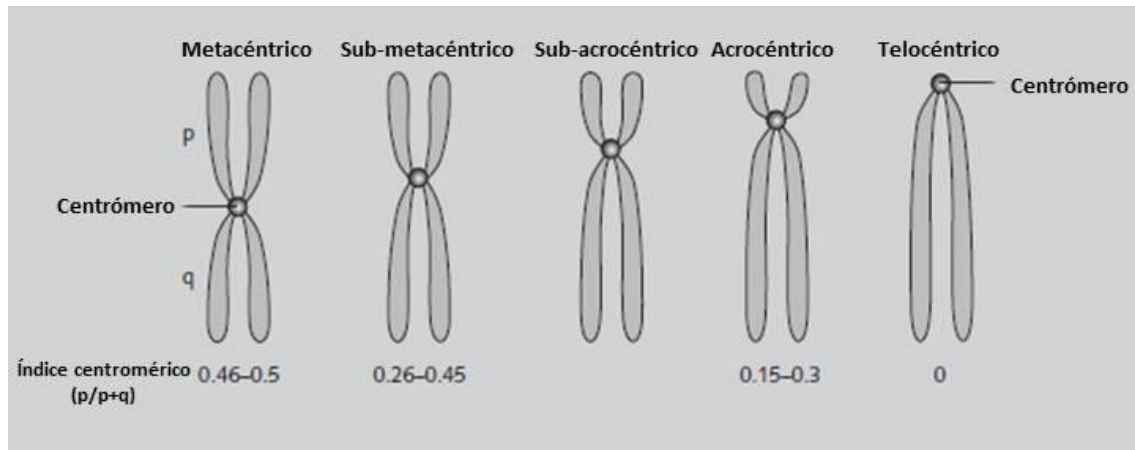


Figura 3: Clasificación de los cromosomas según la posición del centrómero. Modificado de Sumner, 2003.

1.2 Citogenética clásica y molecular

Entre los años 1960-1970 el descubrimiento y la aplicación de las técnicas de bandas cromosómicas ha significado una de las innovaciones más importantes en la citogenética clásica (Ferguson-Smith, 2015). Éstas, se corresponden con variaciones en la estructura longitudinal de la cromátide, puestas en evidencia por las distintas técnicas de tinción. Cada par de cromosomas homólogos se diferencia de los otros pares por su contenido de secuencias de ADN repetitivo y por la constitución de la cromatina en términos de secuencias de bases (bandas G y bandas R). Existen a su vez, técnicas de bandas especializadas que identifican y revelan regiones particulares del cromosoma, por ejemplo, segmentos de heterocromatina y secuencias repetidas (bandas C), regiones organizadoras nucleolares (bandas Ag-NOR o impregnación argéntica), heterocromatina telomérica, centromérica o ADN satélite, entre otras. La utilidad de estas técnicas, reside principalmente en que los patrones de bandas obtenidos serán idénticos de una célula a otra, de un tejido a otro y de un individuo a otro de la misma especie, con la excepción de las regiones polimórficas. La fidelidad de los patrones de bandas tiene su origen en la organización subyacente a las secuencias de ADN y las proteínas asociadas en el cromosoma, ya que dicha organización se mantiene de una división celular a la siguiente (Sumner, 1990).

Con el desarrollo de la hibridación *in situ* (ISH) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), nace la citogenética molecular que, podría definirse como la fusión entre la citogenética clásica y la biología molecular. Ambos métodos de hibridación, se consideran técnicas básicas de las cuales se desprende una serie de derivaciones con aplicaciones específicas (Pardue y Gall, 1969; Rudkin y Stollar, 1977; Herrera, 2007). Estos avances metodológicos permitieron incorporar considerables mejoras en la resolución de los estudios cariológicos dando origen a

nuevos abordajes en el análisis de la estructura y dinámica cromosómica (Gokhman y Kuznetsova, 2006).

La técnica de FISH permite la localización de secuencias específicas de ADN en una determinada región cromosómica (Pardue y Gall, 1969; Rudkin y Stollar, 1977). Ha sido de gran utilidad al momento de estudiar la cantidad y distribución de los *clusters* de genes ribosomales en los cromosomas, por ejemplo (Sumner, 1990).

1.3 Heterocromatina y genes ribosomales

Existe un conjunto de características y propiedades que han definido a la heterocromatina más allá de su visualización citogenética. Entre éstas se encuentran niveles muy reducidos de recombinación meiótica, baja densidad génica, replicación tardía durante la fase S, inactividad transcripcional, enriquecimiento en secuencias altamente repetitivas de ADN satélite y remanentes de elementos móviles (Dimitri et al., 2009).

La heterocromatina es una estructura mucho más compleja: se trata de un ordenamiento en mosaico compuesto por diferentes tipos de secuencias mediana y altamente repetitivas, satélites e incluso, secuencias únicas empaquetadas dentro de la misma heterocromatina (Avramova, 2002; Tremethick, 2007). Estas repeticiones pueden variar de una composición rica en A-T a una rica en G-C y desde longitudes de repetición de 2 pb, a unidades repetidas de cientos o miles de pares de bases (Hoyer-Fender et al., 2000). Sin embargo, a pesar de la compleja definición a partir de su secuencia y unidades de repetición, la heterocromatina muestra como patrón común y consistente, la metilación de citocinas y la presencia de ciertas proteínas específicas (Sumner, 2008). Se ha demostrado que el estudio de su distribución y composición provee información esencial sobre la evolución de los cromosomas en eucariotas, resultando de un gran valor diagnóstico en los estudios citogenéticos (Hoshiba e Imai, 1993, 2020; Siljak-Yakovlev et al., 2010; Penagos-Puig y Furlan-Magaril, 2020).

La técnica de bandas C, fue la primera en utilizarse para estudiar a la heterocromatina y, revela su distribución, localización y proporción del cariotipo que se corresponde con ella, tanto en los cromosomas metafásicos como en los núcleos interfásicos. Es la más utilizada y citada cuando se estudian los cariotipos de insectos (Hoshiba e Imai, 1993; Gokhman, 1997; Kuznetsova et al., 1997; Palomeque et al., 1998; Bugrov et al., 2001; Gokhman y Kuznetsova, 2006; Carabajal Paladino et al., 2013). Asimismo, cuando se tratan los cromosomas con algunos fluorocromos, se pone en evidencia la composición específica de bases de la heterocromatina, permitiendo establecer si está enriquecida en bases A-T, G-C o, si su composición es balanceada. En particular, el antibiótico cromomicina A3 (CMA₃) tiñe los segmentos cromosómicos ricos en nucleótidos G-C, mientras que el DAPI (4', 6-diamidino-2-

fenilindol) tiñe regiones del ADN con prevalencia de pares de bases A-T (Gokhman y Kuznetsova, 2006). Una composición diferencial de bases implica orígenes independientes de la heterocromatina; por lo tanto su caracterización molecular resulta esencial para estudios filogenéticos comparativos y taxonómicos (Domingues et al., 2005).

En los organismos eucariotas, las regiones NOR se localizan en un determinado número de cromosomas (originando en general, constricciones secundarias) y varían en número dependiendo de la especie. El *cluster* de genes ribosomales consiste en una unidad básica repetida formada por un espaciador no transcrito (NTS), también denominado espaciador intergénico (IGS) ya que existe evidencia de que a veces se transcribe, y los genes ribosomales, separados por espaciadores transcritos internos (ITS). Toda la unidad repetitiva suele ser rica en G-C (Miller y Sollner-Webb, 1981; Sumner, 2003). En la mayoría de los organismos, los genes ribosomales se presentan en un orden particular y, codifican para los ARN ribosomales (ARNr) 18S, 5.8S y 28S, que se transcriben como una sola unidad de ARNr 45S, que luego se procesa en los componentes individuales (Sumner, 2003) (Figura 4). Asimismo, se ha descrito un cuarto gen ribosomal (5S) que se organiza en repeticiones en tándem, se transcribe separadamente de los otros tres ARNr y no integra la región nucleolar (Drouin y De Sa, 1995; Carabajal Paladino, 2011). Cuando se realiza FISH para estudiar la localización cromosómica de genes ribosomales, el tamaño de la señal de hibridación de una región NOR es proporcional al número de cistrones ribosomales que contiene (Wachtler et al., 1986; Leitch y Heslop-Harrison, 1992; Suzuki y Sakurai, 1992; Carabajal Paladino, 2011). La determinación del número y localización de los loci de ADN hace de ellos un importante marcador cromosómico, que puede ser muy útil para la identificación taxonómica de especies, el análisis de la evolución del cariotipo y para un mejor conocimiento de la estructura y organización cromosómica (Goday et al., 2006; Giardini et al., 2015; Carabajal Paladino, 2011).



Figura 4: Esquema de distribución del *cluster* de genes ribosomales. Se muestran las regiones codificantes (18S, 5.8S y 28S) y no codificantes (ITS1 e ITS2).

11.4 Los cromosomas politénicos

Los cromosomas politénicos se forman a partir de los cromosomas de núcleos diploides, por duplicación sucesiva de cada cromátida. Dicho proceso está asociado con la eliminación de la última etapa de la mitosis, luego de cada duplicación del ADN. Esto resulta en un ciclo celular de sólo dos fases, la fase S (Síntesis) y la G (Intersíntesis) también reconocido como endociclo.

Al final de la fase S, las hebras de ADN no segregan, permaneciendo apareadas y formando los cromosomas politénicos (Stormo y Fox, 2017; Shen, 2019). Este tipo de cromosomas se han descrito en ciertos tejidos de diversas especies de insectos, plantas, animales y organismos unicelulares (Stormo y Fox, 2017). Poseen patrones característicos de alternancia de bandas oscuras y claras que son fácilmente observables con un microscopio óptico (Figura 5). Algunos trabajos previos mencionan una posible correspondencia lineal entre el número de genes y el número de bandas e interbandas que reflejarían dominios de cromatina funcionalmente diferente (Puppels, 1999). Otra hipótesis propone que el patrón de bandas-interbandas es un reflejo de la actividad transcripcional local, más que de la distribución de material genético y no genético (Zhimulev et al., 1981; Hill y Rudkin, 1987). La actividad transcripcional también se evidencia por la formación de regiones engrosadas, estructuras llamadas *puffs* (Figura 5), que estarían reflejando la transcripción activa del material genético que se encuentra en ese sector del cromosoma (Gariou-Papalexiou et al., 1999).

Los cromosomas politénicos han sido muy estudiados en los dípteros, especialmente en los géneros *Drosophila*, *Chironomus* y *Rhynchosciara*. La claridad de la estructura en bandas de estos cromosomas, combinados con el inmenso conocimiento de la genética de estas moscas, los hizo valiosos objetos de estudio que permite correlacionar entre estructura cromosómica y génica (Sumner, 2003). Se han descrito cromosomas politénicos en al menos otros cuatro grupos de insectos (Cassagnau, 1974; Sumner, 2008).

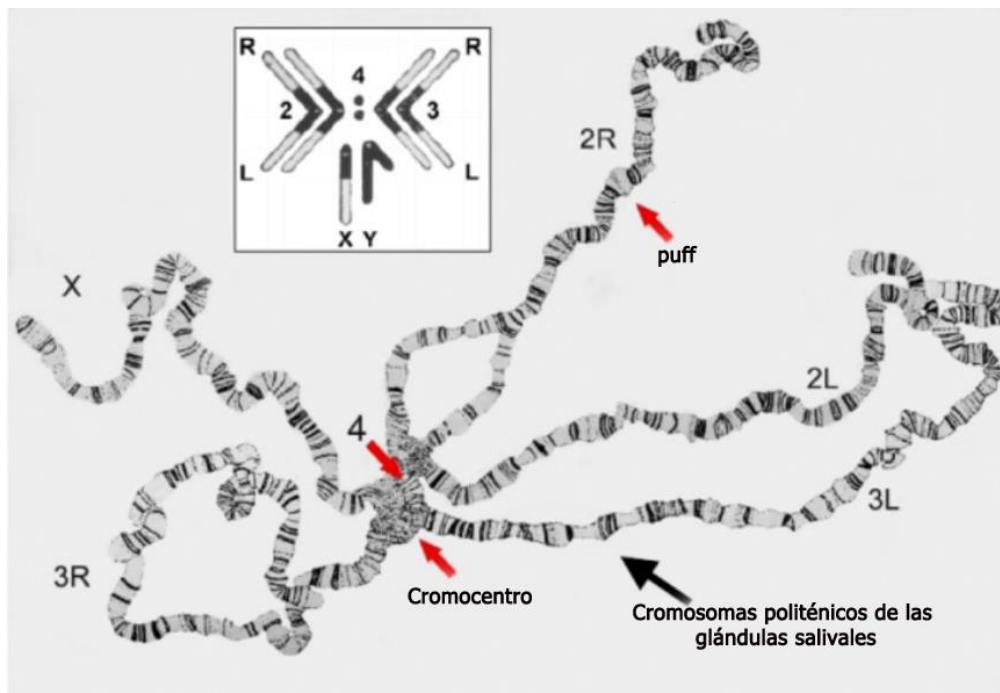


Figura 5: Cromosomas politénicos de glándulas salivales de *D. melanogaster*. Las flechas señalan: los cromosomas politénicos, el cromocentro, *puff*. Extraído y modificado de (Painter, 1934).

Desde la primera publicación de los mapas de cromosomas politénicos de *Drosophila* (Bridges, 1935), estos han demostrado ser un excelente instrumento para el estudio de la estructura y función cromosómica, la actividad genética, las relaciones filogenéticas y han servido como herramientas de diagnóstico para distinguir miembros de complejos de especies (Coluzzi et al., 1979, 2002; Ashburner et al., 1982; Krimbas y Powell, 1992; Zhimulev et al., 2004; Ayala y Coluzzi, 2005).

Para las especies de insectos plaga de la familia Tephritidae, los avances en el campo de la citogenética en general, y los cromosomas politénicos en particular, han contribuido a la comprensión de la variación, la evolución y los fenómenos de especiación incipiente, así como al desarrollo y a la mejora de los métodos de control de plagas. El mapa de los cromosomas politénicos de la mosca del Mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Bedo, 1987; Zacharopoulou, 1990), por ejemplo, resultó de utilidad en la selección de cepas de moscas para la implementación de la TIE. Para esta estrategia, se generaron líneas de insectos con características fenotípicas particulares (por ejemplo, color de pupa) y posteriormente estos rasgos fueron asociados al sexo mediante translocación de regiones autosómicas al cromosoma Y. De esa manera, se obtuvieron líneas de moscas en las cuales era posible diferenciar y separar los sexos tempranamente en el desarrollo (líneas de sexado genético) (Cladera, 1995; Cladera y Delprat, 1995). Para la evaluación y caracterización citológica de estas líneas de insectos con translocaciones cromosómicas, los preparados de cromosomas politénicos fueron de gran utilidad (Gariou-Papalexioy et al., 2002; Robinson, 2002; Franz, 2005). De manera similar, el análisis citogenético de mapas de cromosomas politénicos ha ayudado al análisis de líneas de sexado genético en otras especies de tefrítidos, como *Bactrocera dorsalis*, *Zeugodacus cucurbitae* (Zacharopoulou y Franz, 2013) y *Anastrepha ludens* (Zepeda-Cisneros et al., 2014).

11.5 Aplicación de las técnicas de citogenética en insectos

Los estudios cromosómicos en insectos permitieron identificar diferencias entre especies y polimorfismos entre individuos o poblaciones de la misma especie. Especialmente relacionados con el tamaño de los cromosomas y la localización de los bloques de heterocromatina (Dobzhansky, 1941; White, 1973; Wuelker et al., 1989; King, 1993; Gunderina et al., 2005; Gokhman y Kuznetsova, 2006). Particularmente en los dípteros, el cariotipo ha sido una herramienta importante en los estudios filogenéticos (Gokhman y Kuznetsova, 2006). Tal es el caso de los polimorfismos de presencia y cantidad de cromosomas B o accesorios, por citar un ejemplo (Hewitt, 1979; Stegnii, 1993; Polukonova et al., 2005; Gokhman y Kuznetsova,

2006). Un argumento adicional para incluir los polimorfismos cromosómicos en los estudios de filogenia, es el hecho de que los caracteres cariotípicos, a diferencia de otras características morfológicas, son en su mayoría hereditarias y cambian independientemente del medio ambiente. Su utilización se hace aún más importante en aquellos casos en que los estudios de caracteres morfológicos tradicionales (morfométricos en general), no proporcionan una filogenia resuelta (White, 1973; King, 1993; De Fátima Ruas et al., 2005; Gokhman y Kuznetsova, 2006; Furo et al., 2020).

En vista de las ventajas de los aspectos cariotípicos como caracteres diagnósticos, la utilización de los cromosomas en estudios taxonómicos se ha expandido en forma notable, particularmente en grupos de insectos de importancia económica, incluidas plagas agrícolas y forestales como es el caso de algunos áfidos (Blackman et al., 1980; Blackman et al., 1987; Blackman, 1990; Fyodorova et al., 1991; Battisti et al., 1998; Cook et al., 2002; Gavrillov y Kuznetsova, 2004; Gokhman y Kuznetsova, 2006), vectores de enfermedades (Coluzzi et al., 2002; Gokhman y Kuznetsova, 2006), y entomófagos que controlan las poblaciones de plagas como las abejas parasíticas, por ejemplo (Whitten, 1971; Foster et al., 1972; Gokhman y Kuznetsova, 2006).

En el caso de la mosca sudamericana de la fruta *A. fraterculus*, los trabajos realizados previamente en poblaciones silvestres de Argentina describieron la existencia de un polimorfismo cromosómico ocasional en el par sexual (Lifschitz et al., 1999; Manso y Basso, 1999; Basso et al., 2003). Estos estudios describieron la presencia de cuatro variantes morfológicas del cromosoma X y seis variantes del cromosoma Y; todos detectados minoritariamente (Lifschitz et al., 1999; Manso y Basso, 1999; Basso et al., 2003). Estudios posteriores han descrito cariotipos (o cariomorfos) compuestos por sólo dos variantes de cada cromosoma sexual (denominados X_1 , X_2 e Y_5 , Y_6) (Giardini, 2006; Cladera et al., 2014; Giardini et al., 2015). Estos cariomorfos hallados son parte de una problemática a resolver y constituyen la primera evidencia de polimorfismos cromosómicos detectados en un morfotipo del complejo *A. fraterculus sensu stricto*.

OBJETIVOS - Capítulo 1

1- Caracterizar citológicamente el cariotipo mitótico y el complemento politénico de *Anastrepha fraterculus* sp. 1.

1.1: Describir las variantes cariotípicas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 sobre preparaciones cromosómicas obtenidas a partir de ganglio cerebral (cromosomas mitóticos). Analizar la distribución de la heterocromatina y de regiones ricas en secuencias nucleotídicas A-T/G-C mediante el análisis de bandas C y bandas DAPI/CMA₃.

1.2: Detallar el mapa de cromosomas politénicos sobre preparaciones obtenidas a partir de glándulas salivales de *A. fraterculus* sp. 1. Estudiar el patrón de bandas de cada uno de los cromosomas del complemento.

1.3: Caracterizar el cariotipo mitótico y el complemento politénico de *A. fraterculus* sp. 1, aplicando la técnica de FISH con sonda especie-específica del arreglo de genes ribosomales.

MM1: MATERIALES Y MÉTODOS

MM1.1: Objetivo 1.1- Estudio de cromosomas mitóticos

MM1.1.1 Material Biológico

Los individuos analizados para llevar a cabo este objetivo, procedieron de la línea Af- IGEAF que fue establecida en el laboratorio en el año 2007, con aproximadamente diez mil (10000) pupas provenientes de la cría semi-masiva de la Estación Experimental Obispo Colombres de San Miguel de Tucumán (Tucumán, Argentina) y mantenida hasta el día de hoy bajo condiciones artificiales de cría (150 generaciones aproximadamente) (Jaldo et al., 2001).

MM1.1.2 Obtención de preparaciones cromosómicas a partir de ganglio cerebral

Para la obtención de preparaciones de cromosomas mitóticos, se procedió a la disección de larvas de *A. fraterculus* sp. 1 de estadio 3 (MM1.1.1), para extraer el ganglio cerebral, según el protocolo descrito por Guest y Hsu (1973) con algunas modificaciones. Brevemente:

- Se disecciona rápidamente la larva en solución Ringer (solución fisiológica utilizada para insectos: 0,9 % NaCl, 0,02 % CaCl, 0,02 % KCl, 0,01 % NaHCO₃ pH 6.9).
- El ganglio cerebral se transfiere a una solución hipotónica de citrato de sodio 1 % y se incuba 10-15 min.
- El material se fija en una solución de metanol: ácido acético glacial 3:1 durante 30-60 s.
- Se homogeniza el tejido en una solución de ácido acético glacial al 60 % (v/v), se corta con agujas de disección y se rueda con micropipeta sobre el portaobjetos.
- Se procede a la fijación y extensión del homogenato por calor sobre un portaobjeto en plancha caliente a 45-55 °C.
- Se deja secar a TA.

MM1.1.3 Aplicación de técnica de bandas: Bandas C y DAPI/CMA₃

Bandas C [(Canovai et al., 1994) para *Ceratitidis capitata*; posteriormente adaptado por Selivon y Perondini, (1997) para las especies del género *Anastrepha*].

- Se envejecen las preparaciones mitóticas obtenidas en MM1.1.2, dejándolas una semana aproximadamente a 25°C o calentándolas durante 3 h a 60°C.
- Se hidrolizan los cromosomas en HCl 0,2 N durante 10 min.
- Se enjuagan con abundante agua destilada.
- Se incuban luego en Ba (OH)₂ 5 %, 2 min a 50°C. La solución de Ba (OH)₂ está sobresaturada, se deja precipitar mientras se toma la temperatura y, antes de sumergir los preparados, se resuspende con pipeta Pasteur.

- Luego del Ba (OH)₂, se enjuagan los preparados con abundante agua destilada y se incuban en 2xSSC, 1h a 60 °C.
- Se vuelven a enjuagar con agua destilada.
- Se tiñen con Giemsa 10 %, 5 min La reacción se detiene con agua corriente y los preparados se observan luego bajo microscopio.

Bandas DAPI/ CMA₃ (Schweizer y Ambros, 1994, con modificaciones)

- Se deshidratan las preparaciones mitóticas obtenidas en MM1.1.2 en una serie de alcoholes (70 %, 90 % y 100 %), 2 min cada uno y se dejan secar al aire.
- Se lavan los preparados con buffer Mc Ilvaine y se los tiñe con DAPI en cámara húmeda, en oscuridad durante 20 min (75 µl de DAPI, solución de trabajo-10 µg/ml; cubreobjetos plástico, cámara húmeda con 2xSSC).
- Se lavan, alternando agua destilada-buffer Mc Ilvaine-agua destilada. Entre lavado y lavado se retira el exceso de líquido, golpeando el portaobjetos contra la pared de la bandeja.
- Se les coloca luego, 50 µl de CMA₃ (0,6 mg/ml en buffer Mc Ilvaine) con cubreobjetos plástico y se mantienen en cámara húmeda, en oscuridad ON.
- Después de la tinción con CMA₃, se lavan, alternando agua destilada-buffer Mc Ilvaine-agua destilada. Se retira el exceso de líquido entre lavado y lavado, de la misma manera que luego del DAPI.
- Se secan al aire los preparados, colocándolos sobre un papel absorbente, se montan con *antifade* (ThermoFisher Scientific) y sellan.
- Antes de su análisis, se dejan en la heladera en oscuridad una semana o a 37°C durante 3 días en oscuridad.

MM1.1.4 Procesamiento, edición y análisis de imágenes

Medición de los cromosomas, índice centromérico y porcentaje de heterocromatina

Los cromosomas se miden con el programa Micromesure 3.3. Se toman valores de la longitud total de cada cromosoma, longitud de cada uno de los brazos, índice centromérico (IC) y porcentaje de heterocromatina.

El IC es el cociente entre la longitud del brazo corto y la longitud total del cromosoma. Toma un valor máximo de 0,5, ya que el brazo menor no puede superar la mitad del cromosoma.

El porcentaje de heterocromatina se calcula para los cromosomas sexuales, sobre las fotografías correspondientes a bandas C. Se mide la "longitud" del/los bloque/s de heterocromatina de cada uno de los cromosomas, sobre el 100 % que corresponde a cada cromosoma completo y se calcula su valor medio.

Captura y edición de imágenes

Las imágenes fueron tomadas con la cámara Leica DFC340 FX del microscopio Leica DMLB.

La edición de las imágenes, ajuste de brillo y contraste, pseudocoloreado de imágenes tomadas en blanco y negro y fusión de imágenes tomadas con diferentes filtros de microscopio, se realizó con el programa Photoshop (Adobe Photoshop Cs5 español).

MM1.2: Objetivo 1.2- Estudio de cromosomas politénicos

MM1.2.1 Material Biológico

Los individuos analizados para llevar a cabo este objetivo, provinieron de la línea Af- IGAEF, descrita en MM1.1.1.

MM1.2.2: Obtención de preparados cromosómicos a partir de glándula salival

A partir de las glándulas salivales de larvas de 3er. estadio o pre-pupas (mantenidas a 18°C), de individuos pertenecientes a *A. fraterculus* sp. 1 (MM1.1.1), se realizaron las preparaciones para estudiar el complemento politénico, siguiendo el protocolo descrito por Zacharopoulou (1990).

- La larva se diseca rápidamente en solución Ringer y las glándulas salivales se transfieren a ácido acético 45%, durante 30-60 s.

- Se colocan luego, en un cubreobjetos con 10-15 µl de ácido lacto-acético (ácido láctico: agua: ácido acético 3:2:1), durante 2-3 min y se aplastan.

MM1.2.3: Procesamiento y análisis de las imágenes: Obtención del mapa detallado de cromosomas politénicos

El mapa fotográfico de los cromosomas politénicos se realizó a partir del análisis de imágenes de células de preparaciones de las glándulas salivales. Se seleccionaron las imágenes que mostraban núcleos bien diseminados y/o cromosomas aislados y que mostraban un patrón de bandas definidas claramente. El primer paso fue seleccionar fotografías de cada una de las regiones de cada cromosoma que: a) proporcionaran un patrón de bandas claro y b) que pudiesen mostrar, sin ambigüedades, la continuidad de cada elemento politénico. Posteriormente, las regiones cromosómicas se ensamblaron utilizando el programa Adobe Photoshop CS6, para construir el mapa fotográfico de cada cromosoma politenizado.

MM1.3: Objetivo 1.3 - Citogenética molecular: FISH en cromosomas mitóticos y politénicos de *A. fraterculus* sp. 1.

MM1.3.1 Material Biológico

Los individuos analizados para llevar a cabo este objetivo, provinieron de la línea Af- IGAEF, descrita en MM1.1.1

MM1.3.2: Extracción de ADN y generación de la sonda 18S

El método de extracción de ADN utilizado, fue el descrito por Hoisington y González de León (1994), con modificaciones. Brevemente,

- Se homogenizan con mortero y nitrógeno líquido hasta llegar a polvo, grupos de cinco machos adultos y cinco hembras adultas (por separado) (Michelmore et al., 1991).
- Al homogenato se le agregan 1000 µl de CTAB 2 % precalentado a 65°C, se mezcla y se incuba a la misma temperatura durante 30 min, con agitación suave y continua.
- Se dejan los tubos destapados, 5 min, para que la temperatura descienda y se le agregan 450 µl de cloroformo: octanol (24:1).
- Se mezcla la muestra por inversión durante 10 min hasta obtener una emulsión.
- Se centrifugan los tubos durante 30 min a 14000 rpm y TA.
- Se trasvasa la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml.
- Se le adiciona 5 µl de enzima RNasa (10 mg/ml), se mezcla la solución suavemente por inversión durante 5 min y se incuba 60 min a 37°C.
- Se agregan nuevamente 450 µl de cloroformo-octanol (24:1). Se mezcla la muestra por inversión durante 10 min hasta obtener una emulsión.
- Se centrifugan los tubos durante 30 min a 14000 rpm, a TA.
- Se trasvasa la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- Se precipita el ADN, agregando rápidamente 600 µl de isopropanol frío (-20°C) y se mezcla suavemente por inversión.
- Se realiza un *spin* de centrifuga para precipitar la medusa de ADN.
- Se descarta el sobrenadante y se le hacen tres lavados:
 - sc I, 500 µl, 20 min.
 - sc II, 500 µl, 10 min.
 - ETOH 70 %, 500 µl, frío.
- Se deja secar el precipitado en flujo laminar.
- Por último, se resuspende el precipitado en 50 µl de agua, calidad HPLC.

sc I= ETOH 76% + NH₄AcO 10 mM. Para preparar 500 ml, 380 ml ETOH 100% + 5 ml NH₄AcO 1M + 115 ml de H₂O destilada.

sc II= ETOH 76% + NaAcO 0,2 M. Para preparar 500 ml, 380 ml ETOH 100% + 40 ml NaAcO 2,5M + 80 ml de H₂O destilada.

Cuantificación de ADN

La concentración y la calidad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa y por espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop 1000©.

- Los geles de agarosa tienen una concentración de 0,8 % p/v en Buffer TBE 0,5 %. Se les adiciona bromuro de etidio en una concentración de 1 µg/ml de gel. El ADN se visualiza en un transiluminador UV.

- El equipo Nanodrop© (NanoDrop Technologies, EUA), permite hacer la medición sobre 1 µl de muestra. Se mide la absorbancia de cada muestra a 230 nm (A₂₃₀), 260 nm (A₂₆₀) y 280 nm (A₂₈₀). Los parámetros de calidad de ADN son las medidas 260/280 y 260/230, mostrando una calidad óptima en valores cercanos a 2 para ambos parámetros.

Amplificación por PCR de una región ribosomal, subunidad 18S

La sonda se generó a partir de una PCR específica de una región conservada del gen 18S ADN de aproximadamente 1750 pb utilizando como cebadores, los oligonucleótidos disponibles en la bibliografía (18S-Gal *forward* 5- CGATACCGCGAATGGCTCAATA -3 y 18S-Gal *reverse* (5- ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC -3; Fuková et al., 2005) y como ADN molde, 1 µl de ADN genómico total de *A. fraterculus* sp. 1. Para la amplificación se utilizó un termociclador Multigene (Labnet, EEUU), siguiendo las condiciones de rutina del laboratorio de INTA Castelar que se describen a continuación:

Componente	Concentración Inicial	Concentración Final
Buffer de reacción	20X	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTPs	2 mM	0,25 mM c/u
Oligo <i>Forward</i>	10 µM	0,5 µM
Oligo <i>Reverse</i>	10 µM	0,5 µM
Taq (Inbio Highway)	500 U	0,8 U
H ₂ O ultra pura, Invitrogen hasta completar 20 µl		

Se utilizó el siguiente ciclo de amplificación (Fuková et al., 2011)

Programa: 94°C	3 min	} 35 ciclos
94°C	1 min	
50°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

El producto de amplificación de la reacción de PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con buffer TBE 0,5 X y teñido con bromuro de etidio. Para confirmar la identidad del producto de amplificación obtenido se purificó el fragmento de PCR mediante el método de precipitación por sales (Sambrook y Russell, 2001). Posteriormente, se midió la concentración y calidad del fragmento de PCR purificado en Nanodrop 1000© y se realizaron las diluciones necesarias para llegar a la concentración requerida para secuenciación por el método de Sanger en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica (IB, INTA, IABIMO-CONICET). Se obtuvieron las secuencias de nucleótidos utilizando los oligonucleótidos *forward* y *reverse* anteriormente empleados para la obtención del producto de PCR. A continuación, se procesaron las secuencias obtenidas mediante Bioedit (Hall, 1999) y se compararon contra la base de datos de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante Blastn (Altschul et al., 1990).

Los resultados obtenidos confirmaron la identidad de la secuencia como perteneciente a *A. fraterculus* mediante la comparación de las secuencias obtenidas contra las bases de datos del NCBI usando BLASTn (Figura 1 y 2-Anexo).

Marcación de la sonda (Steinberg et al., 2014; Fantini, 2015)

La marcación de la sonda, se realizó en forma directa por *Nick translation* (Rigby et al., 1977), con una concentración final (C_F) [$20 \text{ ng}/\mu\text{l}$] $_F$ de ADN total para $50 \mu\text{l}$ de reacción. Se utilizó como ADN, el fragmento de PCR previamente purificado. NT Mix corresponde a un *buffer* comercial Lexel LIVE y los fluorocromos utilizados, también son comerciales y corresponden a Fluoresceína-12-dUTP y Rhodamine-5-dUPT.

ADN	Volumen según []
NT Mix	4 μl
Fluorocromo	0,5 μl
H ₂ O	Hasta completar V_F
V_F	25 μl

Programa: 4°C 2 min
 15°C 90 min
 94°C 5 min
 18°C 15 min

En la Figura 6, se muestra en forma esquemática el diseño de la sonda 18S.



Figura 6: Esquema de la sonda específica del gen 18S de los genes ribosomales nucleares diseñada para *A. fraterculus* sp. 1. Se indica en rojo el fluorocromo utilizado para la marcación.

La confirmación de la eficiencia de marcación de la sonda 18S consistió en la realización del experimento de FISH correspondiente.

MM1.3.3 FISH con sonda del gen ribosomal 18S de A. fraterculus sp. 1 (Sahara et al., 1999; Nieves et al., 2005; Steinberg et al., 2014)

Las preparaciones de cromosomas mitóticos, se realizaron siguiendo el protocolo tradicional, citado en la sección MM1.1.2.

- Se envejecen 2 ó 3 días a 25°C antes de proceder a la hibridación.
- Como sonda, se utiliza la región codificante del gen ribosomal 18S de *A. fraterculus*, marcada con fluoresceína o rodamina.
- Luego del envejecimiento, los preparados se deshidratan en una serie de alcoholes (70 %, 90 % y 100 %), 2 min cada uno y se dejan secar al aire.
- Se enjuagan en 2xSSC a TA.
- Se desnaturalizan 5 min en formamida al 70 % en etanol, a 65°C y se vuelven a deshidratar con la serie de alcoholes.
- Luego de esta segunda deshidratación, se les coloca la sonda 18S (previamente desnaturalizada 5 min a 70°C) y se los incuba ON a 37°C en cámara húmeda.
- Al día siguiente, se los revela mediante un revelado rápido: 0,4xSSC/0,3% Tween, 70°C, 2 min y 2xSSC/0,1 % Tween, TA, 2 min.
- Después del revelado, se tiñen con DAPI y se montan con *antifade* (ThermoFisher Scientific) para su observación con microscopio de epifluorescencia Olympus BX40F.

En el caso de las preparaciones de cromosomas politénicos, que van a utilizarse para FISH:

- Las preparaciones satisfactorias que se obtuvieron mediante el protocolo detallado en MM1.2.2, se colocan horizontalmente para que se aplanen, ON a -20 °C.

- Al día siguiente, se les retira el cubreobjetos por inmersión en nitrógeno líquido. Se deshidratan en ETOH 100 % 10 min, se secan al aire y se mantienen a TA hasta ser usados para el FISH (Drosopoulou et al., 2012).
- Se aplica el mismo protocolo de hibridación con sonda 18S utilizado para cromosomas mitóticos de la sección anterior.

R1: RESULTADOS

R1.1: ANÁLISIS EN CROMOSOMAS MITÓTICOS

R1.1.1 El Cariotipo mitótico de *Anastrepha fraterculus* sp.1*Caracterización numérica y morfológica-Citogenética clásica*

Se analizaron 100 preparados de cromosomas mitóticos correspondientes a 100 individuos provenientes de la línea Af-IGEAF de *A. fraterculus* sp. 1 (MM1.1.1) (10 metafases por individuo). Siguiendo el sistema establecido por Radu et al. (1975), el cariotipo de *A. fraterculus* sp. 1, consiste en seis pares de cromosomas $2n=12$, con un par de cromosomas sexuales y cinco pares de autosomas (Figura 7). El par sexual X/Y, corresponde al par N° 1 y los autosomas fueron designados como par N° 2 a 6 en orden descendente de tamaño (Figura 7 A y B). Las hembras son el sexo homogamético (XX) y los machos son el sexo heterogamético (XY). Ambos cromosomas sexuales son altamente heterocromáticos y fácilmente distinguibles. El cromosoma X es submetacéntrico grande, con un índice centromérico (IC) = 0,268, dependiendo de su grado de condensación, es de tamaño similar a los cromosomas del par 2 (Tabla 2). El cromosoma Y es el elemento de menor tamaño del cariotipo y de morfología meta-submetacéntrica (IC= 0,400) (Tabla 2).

En todos los preparados analizados los autosomas mostraron ser acrocéntricos. Los pares 2 y 3 se diferencian de manera clara por su longitud; los pares 4, 5 y 6 son prácticamente del mismo tamaño y, según el grado de compactación que tenga su cromatina, son indistinguibles (Figura 7, Tabla 2).

En la Figura 7, se muestran los cariotipos de una hembra y un macho de *A. fraterculus* sp. 1 (Figura 7 A y B).

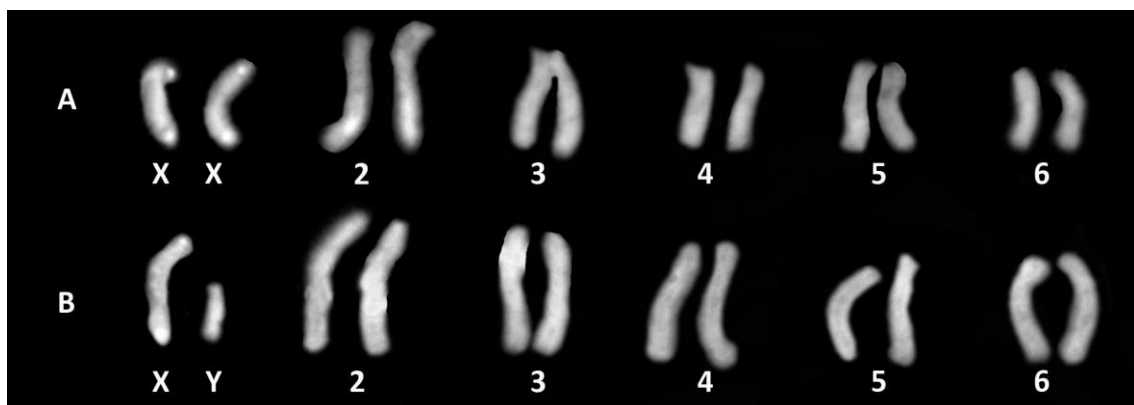


Figura 7: Cariotipo con tinción DAPI, de hembra y de macho de *Anastrepha fraterculus* sp. 1. A) Cariotipo de hembra. B) Cariotipo de macho.

En la Tabla 2, se muestran los IC de cada uno de los cromosomas del complemento mitótico de *A. fraterculus* sp. 1 y su morfología. También figuran las variantes de cromosomas sexuales encontradas que se describirán en la sección siguiente.

Tabla 2: Índices centroméricos y morfología de los cromosomas de *A. fraterculus* sp. 1. También figuran en la tabla, las variantes cromosómicas minoritarias X_2 e Y_6 . sm= submetacéntrico, m= metacéntrico, a= acrocéntrico.

Cromosoma	IC	Morfología
X_1	0,268	sm
X_2	0,273	sm
Y_5	0,400	m
Y_6	0,402	m
2	0,060	a
3	0,071	a
4	0,070	a
5	0,072	a
6	0,076	a

Variantes cromosómicas encontradas

Producto del mismo análisis de los 100 individuos provenientes de la línea Af-IGEAF de *A. fraterculus* sp. 1, se identificaron además de los cromosomas sexuales X_1 e Y_5 , las variantes X_2 e Y_6 . El cromosoma X_2 , es de gran tamaño (aproximadamente un 20 % más largo que el cromosoma X_1), de morfología submetacéntrica con un satélite distal. La variante Y_6 es submetacéntrico de tamaño mediano (aproximadamente 20 % más corto que X_1).

En la figura 8, se muestran los cariotipos de hembra y de macho, portadores de las variantes cromosómicas halladas en este trabajo de Tesis Doctoral.



Figura 8: Cariotipo con tinción DAPI, de hembra y de macho de *Anastrepha fraterculus* sp. 1. portadores de las variantes cromosómicas X_2 e Y_6 . A) Cariotipo de hembra con X_2 . B) Cariotipo de macho con Y_6 .

Distribución y caracterización de la heterocromatina

Mediante la técnica de bandas C (MM1.1.3) de preparados mitóticos de *A. fraterculus* sp. 1, se identificaron bloques de heterocromatina en los cromosomas sexuales. Por el contrario, ninguno de los autosomas mostró regiones heterocromáticas evidenciables con esta técnica.

El cromosoma X_1 presenta dos bloques heterocromáticos en los extremos del cromosoma, siendo el distal más grande que el proximal (Figura 9 A-D). Su variante X_2 (Figura 9 B), presenta el mismo patrón de bandas C que el X_1 y, adicionalmente, muestra un bloque de heterocromatina ocupando todo el satélite distal. Por último, el Y_5 , presenta dos bloques de heterocromatina; uno en el extremo proximal, ocupando casi por completo el brazo corto y otro que se encuentra en el brazo largo, de localización intersticial (Figura 9 C y D). En la Figura 9 D, donde el cromosoma Y_5 , se encuentra más descondensado, se logra observar claramente la posición del bloque del brazo largo.

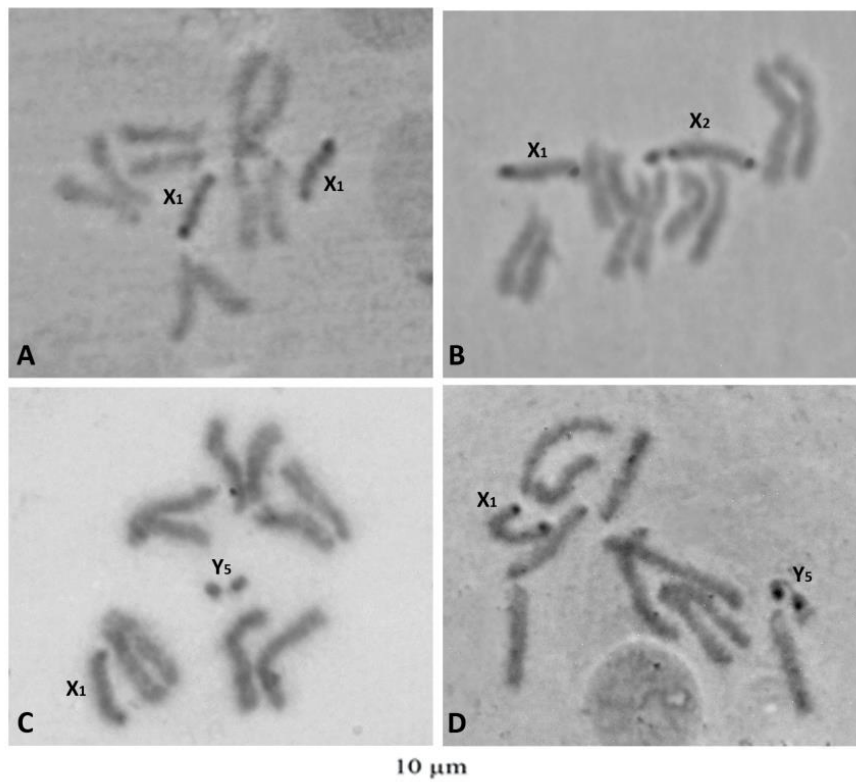


Figura 9: Bandas C en *A. fraterculus*. A) Hembra X_1X_1 , B) hembra X_1X_2 , C) y D) macho X_1Y_5 .

El análisis de la composición de la heterocromatina de *A. fraterculus* sp. 1 a través de la técnica de bandas DAPI/CMA₃ (MM1.1.3) se ilustra en la Figura 10. La heterocromatina del cromosoma X_1 es rica en pares de base A-T, ya que sólo se pone en evidencia con la tinción con DAPI (Figura 10 A-C). Su variante X_2 , muestra el mismo patrón; todos sus bloques de heterocromatina están enriquecidos en secuencias repetitivas A-T (Figura 10 D-E). El cromosoma que mostró un patrón diferente fue el Y_5 (Figura 10 G-I), cuya heterocromatina

posee secuencias repetitivas, ricas tanto en A-T (DAPI positivo, Figura 10 G), como en G-C (CMA₃ positivo, Figura 10 H).

Para completar el estudio de la heterocromatina de *A. fraterculus* sp. 1, en la Tabla 3, se muestra la medición del porcentaje que ésta representa en cada uno de los cromosomas sexuales.

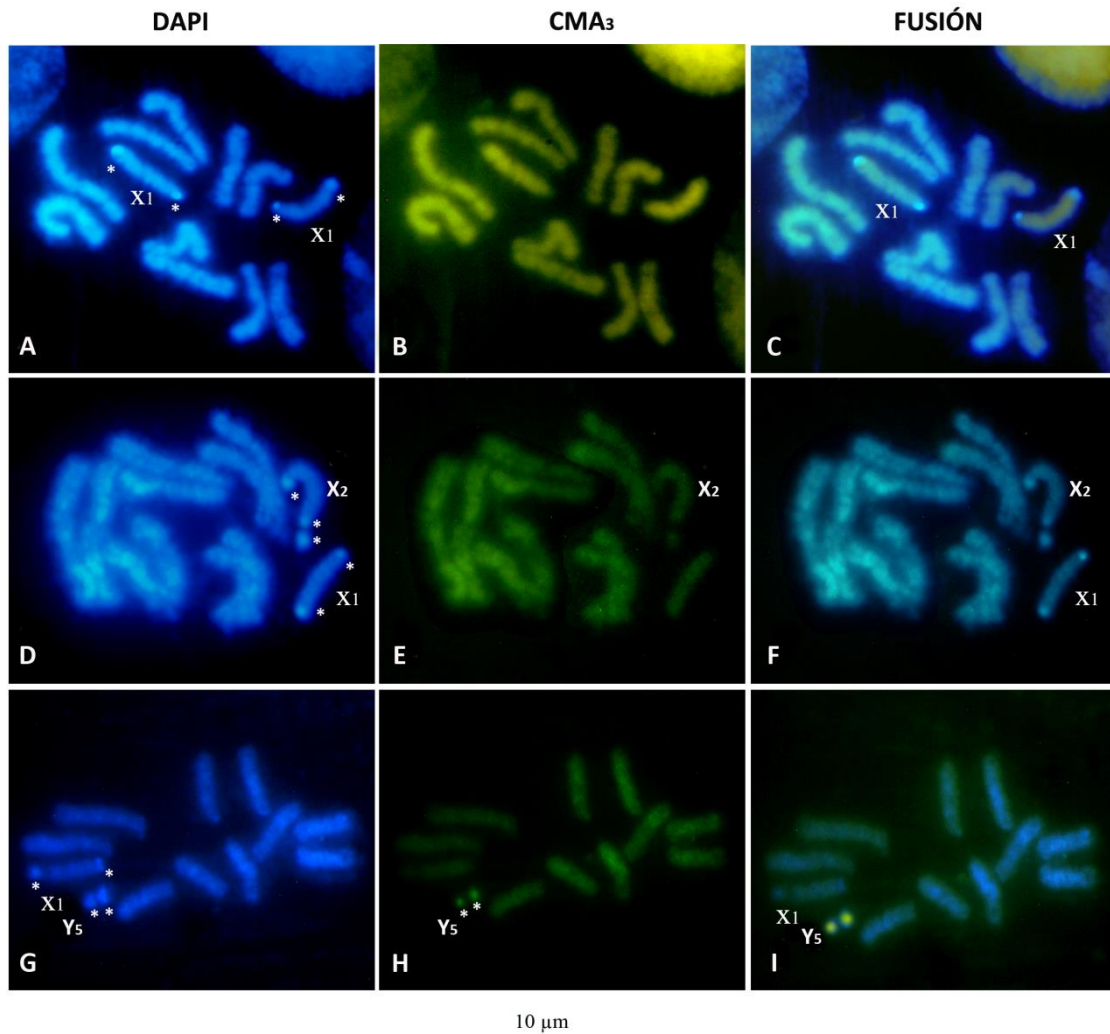


Figura 10: Bandas DAPI/CMA₃ en *A. fraterculus* sp. 1. A, B y C Hembra X₁X₁, D, E y F hembra X₁X₂ y G, H e I macho X₁Y₅. A, D y G corresponden a la tinción con DAPI. B, E y H corresponden a la tinción con CMA₃. C, F e I corresponden a la fusión de las imágenes tomadas con los filtros para DAPI y para CMA₃. Los asteriscos (*) se utilizaron para marcar las señales positivas de DAPI y/o CMA₃.

Tabla 3: Porcentaje de heterocromatina en los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1.

Cromosoma sexual	% Heterocromatina
X ₁	35
X ₂	40
Y ₅	77
Y ₆	80

El cromosoma Y_6 sólo fue estudiado mediante tinción con el fluorocromo DAPI (Figura 11), ya que ninguna de las preparaciones analizadas por bandas C o bandas DAPI/CMA₃ presentó esta variante cromosómica. Este cromosoma presenta dos bloques DAPI positivos, uno ocupando casi todo el brazo corto y otro en posición intersticial en el brazo largo. Considerando que en las otras variantes de cromosomas sexuales la heterocromatina revelada por bandas C coincidió con las regiones DAPI positivas, es posible proponer que las regiones detectadas por la tinción con DAPI en Y_6 son regiones de heterocromatina ricas en A-T; aunque es necesario profundizar su estudio, aplicando la técnica DAPI/CMA₃ en nuevas preparaciones.

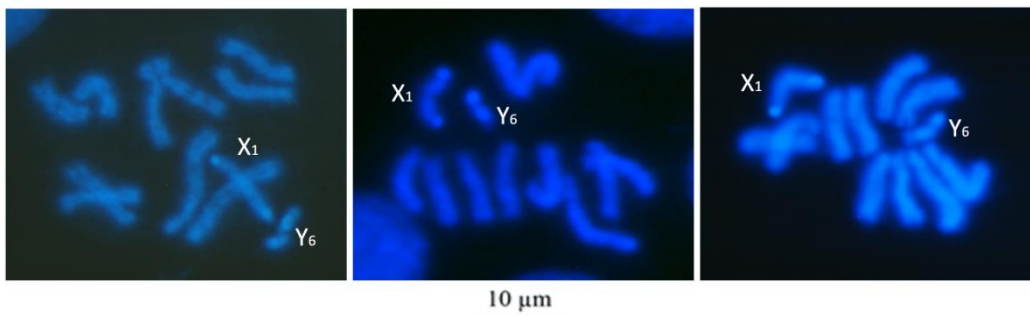


Figura 11: Bandas DAPI en distintas metafases de machos X_1Y_6 de *A. fraterculus*.

R1.2: ANÁLISIS EN CROMOSOMAS POLITÉNICOS

R1.2.1 El Complemento politénico de *Anastrepha fraterculus* sp.1

A partir del análisis de 200 preparados, se confeccionó el mapa detallado de los cromosomas politénicos de *A. fraterculus* sp. 1.

El complemento politénico de *A. fraterculus* sp. 1 consiste en cinco elementos bandeados que, corresponden a los cinco autosomas. Los cromosomas sexuales no politenizan y su presencia queda evidenciada por una red granular heterocromática (Figura 12 A y B). Además, no se observa la formación de cromocentro.

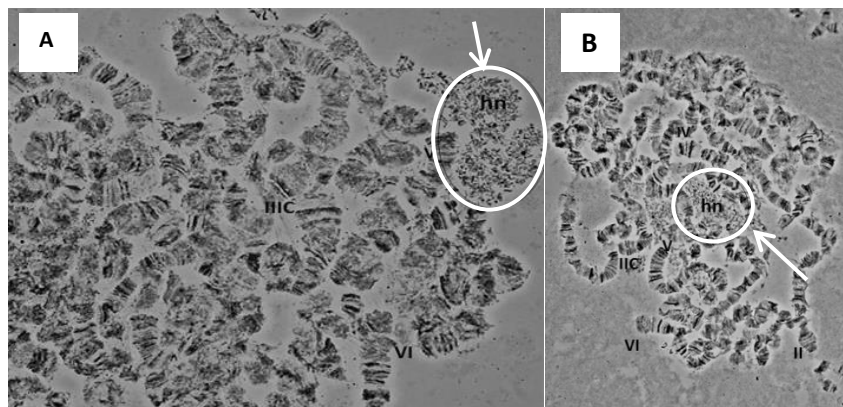


Figura 12: En A y B se muestran dos núcleos politénicos diferentes con la red granular heterocromática (hn) que representa los cromosomas sexuales con baja replicación (no politenizados), indicada con las flechas blancas y los círculos. En ambas figuras se indican los cromosomas politénicos con números romanos. C= centrómero.

Cromosoma II

El cromosoma II es el elemento más largo del complemento y se identifica fácilmente debido a sus dos característicos extremos: el telómero de la sección 1 y el centrómero en la región proximal 22. El telómero suele participar de apareamientos ectópicos con otros telómeros. El centrómero, a menudo, posee hilos heterocromáticos o participa en la formación de un cromocentro parcial (Figura 13).

En general, este cromosoma dispone de regiones con un patrón de bandas claras que ayudan a su identificación. También posee marcas características como la constricción que delimita las regiones 1 y 2, los *puff* de las secciones 4, 7 y 17, y una serie de bandas oscuras en los sectores 9-11 y 13-15.

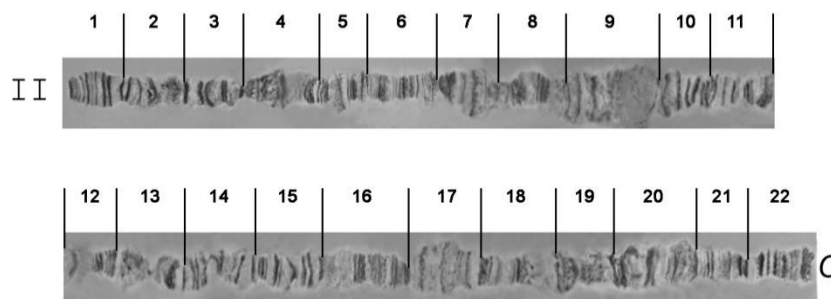


Figura 13: Mapa fotográfico del cromosoma II del complemento politénico de *A. fraterculus* (secciones 1 a 22). C indica el centrómero.

Cromosoma III

El cromosoma III posee un patrón de escaso bandeo y se identifican puntos débiles (o afinamientos) a lo largo de casi toda su extensión, especialmente en las secciones 25 y 34. Su telómero de la zona 23, a menudo está involucrado en apareamientos ectópicos y, junto con la región 24, son marcadores que hacen fácilmente identificable a este cromosoma. La porción 35-44, tiene un patrón de bandas un poco más definido y la sección final 44 posee una masa heterocromática específica que representa a la región centromérica del cromosoma (Figura 14).

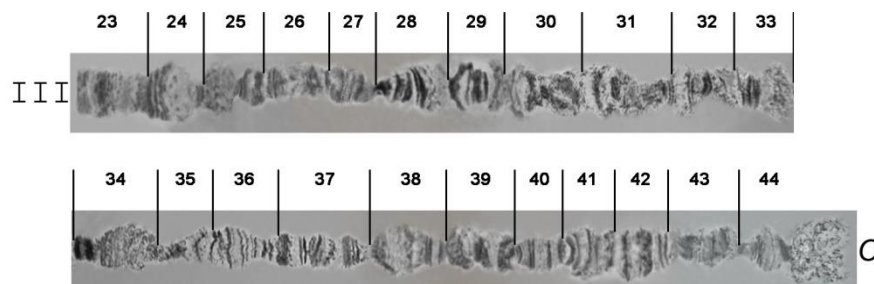


Figura 14: Mapa fotográfico del cromosoma III del complemento politénico de *A. fraterculus* (secciones 23 a 44). C indica el centrómero.

Cromosoma IV

El elemento politénico más distintivo de la especie es el cromosoma IV, con un patrón de bandas característico que comienza en el extremo de la sección 45 y se extiende hasta la sección 55 (Figura 15). El área más característica está comprendida entre las regiones 50 y 51 e incluye dos *puffs* y una serie de bandas entre ellos. Su telómero participa usualmente de apareamientos ectópicos con otros cromosomas del complemento. La región centromérica (sección 64), es muy difícil de identificar. Del mismo modo, existen dificultades para identificar las secciones 56-64 (Figura 15).

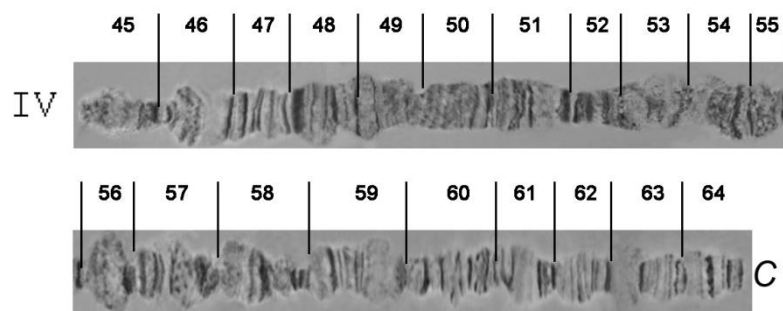


Figura 15: Mapa fotográfico del cromosoma IV del complemento politénico de *A. fraterculus* (secciones 45 a 64). C indica el centrómero.

Cromosoma V

El cromosoma V, tiene un telómero con un patrón de bandas singular que lo hace fácilmente identificable (sección 65) (Figura 16), al igual que la región cercana al centrómero, sección 84. Posee algunas bandas difusas y afinamientos y suele estar conectado con otras regiones centroméricas o participar de un cromocentro parcial. Marcas típicas de este cromosoma son las secciones 66-69, 75 que posee un prominente *puff* seguido de tres bandas y de dos *puffs* en las secciones 82 y 83.

En la Figura 16, se muestra el cromosoma V completo y también una porción alternativa (región 81-84) que corresponde a un patrón diferente de bandas, observado reiteradas veces en algunos preparados analizados. A pesar de que tales variaciones pueden, o no, presentarse a menudo, el hecho de que se halle cerca del característico centrómero de este cromosoma, permite identificar inequívocamente a este elemento politénico.

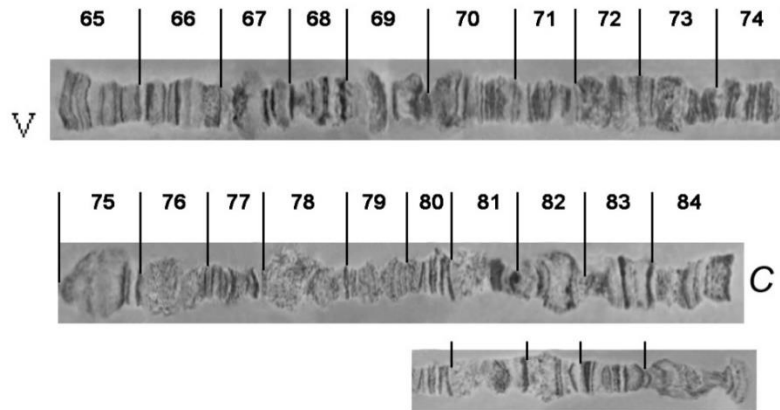


Figura 16: Mapa fotográfico del cromosoma V del complemento politénico de *A. fraterculus* (secciones 65 a 84). El asterisco indica una apariencia alternativa de la región cromosómica 81-84, debido a diferencias en el patrón de *puff*. C indica el centrómero.

Cromosoma VI

Es el más pequeño del complemento y el más difícil de trabajar debido a la fragilidad ocasionada por los numerosos puntos débiles que presenta; que hacen que se rompa con frecuencia. Posee además un patrón con bajo número de bandas y abundantes constricciones. Sin embargo, tiene varias características que pueden usarse para identificarlo: su telómero en la sección 85 y los *puffs* de las zonas 86, 89, 91 y 92 (Figura 17).

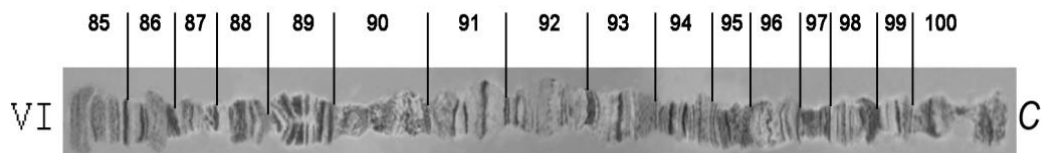


Figura 17: Mapa fotográfico del cromosoma VI del complemento politénico de *A. fraterculus* (secciones 85 a 100). C indica el centrómero.

En la Figura 18, se muestra el mapa completo de cromosomas politénicos, donde se puede observar la diferencia de longitud entre los cromosomas.

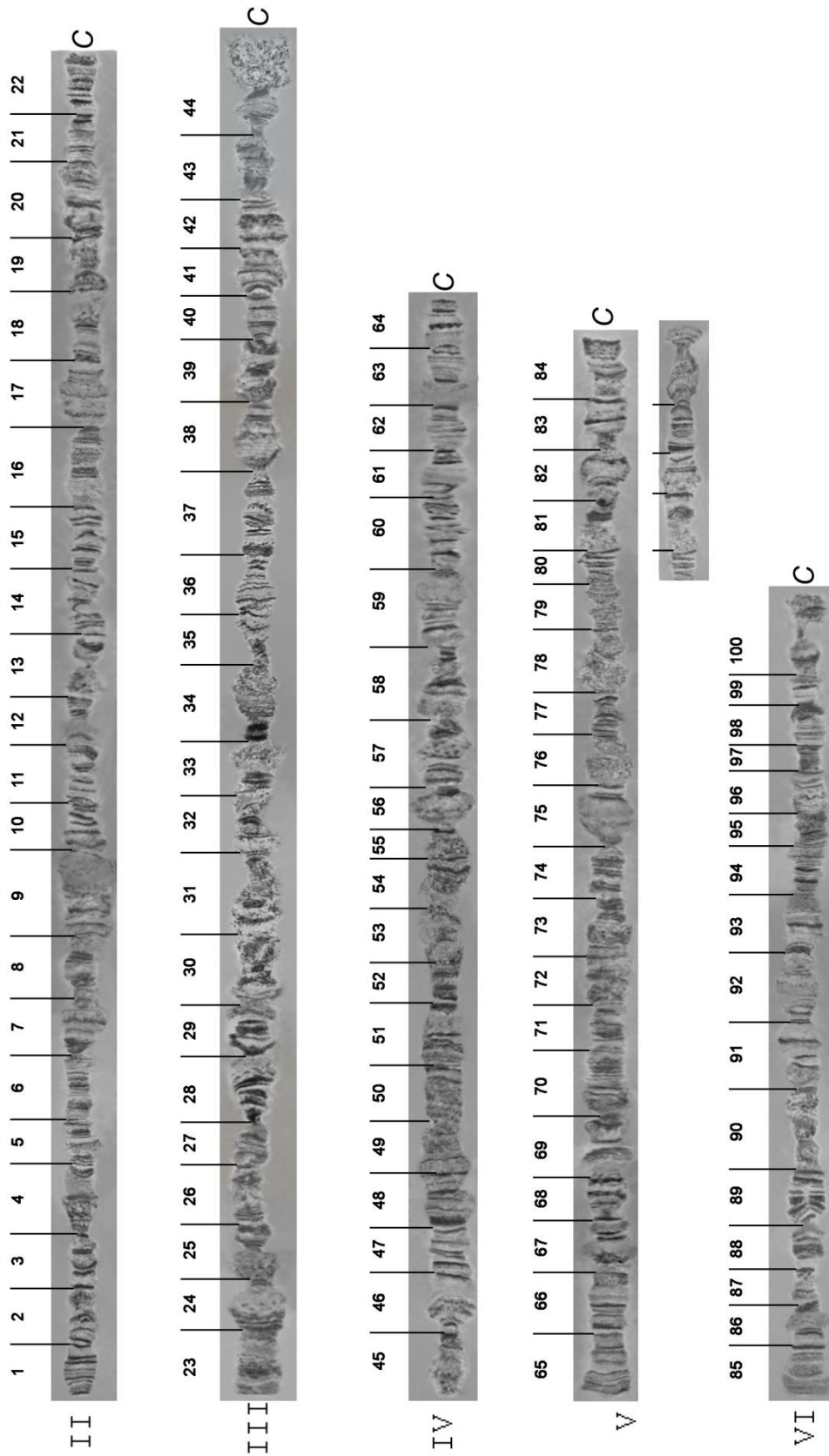


Figura 18: Mapa completo de cromosomas politénicos de las glándulas salivales de *A. fraterculus* sp. 1.

R1.3: FISH EN CROMOSOMAS MITÓTICOS Y POLITÉNICOS

R1.3.1 Caracterización de los cromosomas de *A. fraterculus* sp. 1 mediante FISH*Obtención de la sonda 18S*

Se obtuvo el ADN genómico de cinco insectos adultos de cada sexo (Figura 19). En la Tabla 4 se detallan las mediciones de Nanodrop 1000©. Las muestras de ADN fueron de mediana calidad (dado que el parámetro 260/230 mostró valores bajos), sin embargo, estos valores de calidad fueron suficientes para los ensayos planificados. Los controles utilizados (M_c y H_c), corresponden a extracciones de ADN previas que mostraron buenos valores de los parámetros de calidad y cantidad.

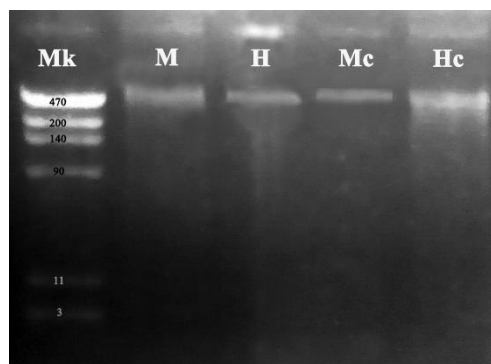


Figura 19: Calidad de material genético obtenido. Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % p/v, de muestras de ADN genómico total de adultos de *A. fraterculus*. Mk= Lambda DNA/HindIII (Fermentas). Líneas 1-4: M= Macho, H= Hembra, Mc= Macho control, Hc= Hembra control.

Tabla 4: Medición de calidad de las muestras de ADN obtenidas (Nanodrop 1000©). M= Macho, H= Hembra, Mc= Macho control, Hc= Hembra control

Muestra	[] ng/μl	260/280	260/230
M	156,1	1,69	0,82
H	543,1	1,63	0,98
Mc	821,5	2,13	1,57
Hc	345	1,84	0,77

Dichas muestras de ADN de *A. fraterculus* sp. 1 se utilizaron como templado para la amplificación por PCR de una región conservada del gen ribosomal 18S. La corrida electroforética del producto de PCR obtenido evidenció una única banda del tamaño esperado (superior a 1000 pb) según se detalla en la sección MM1.3.2 (Figura 20).

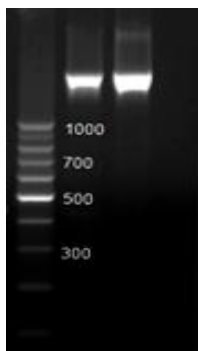


Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % p/v de productos de PCR específica de 18S. Línea 1 marcador de peso molecular 1kb *Ladder* (Invitrogen). Líneas 2 y 3 fragmento de 18S en dos muestras de *A. fraterculus* sp. 1.

Localización de genes ribosomales en preparados de cromosomas mitóticos

Se realizaron experimentos de FISH en 50 preparados de cromosomas mitóticos siguiendo el procedimiento detallado en MM1.3.3, con el cual se localizaron citológicamente los genes ribosomales de *A. fraterculus* sp. 1. En el cromosoma X_1 , los *clusters* de genes ribosomales (señal positiva para FISH) se hallaron en su extremo distal (Figura 21 B y C). En el cromosoma Y_5 , las dos señales positivas encontradas, coinciden con las señales positivas de DAPI/CMA₃ (Figura 21 E y F). En el cromosoma X_2 , los genes ribosomales se encontraron en el extremo distal, incluyendo su satélite (Figura 21 H e I).

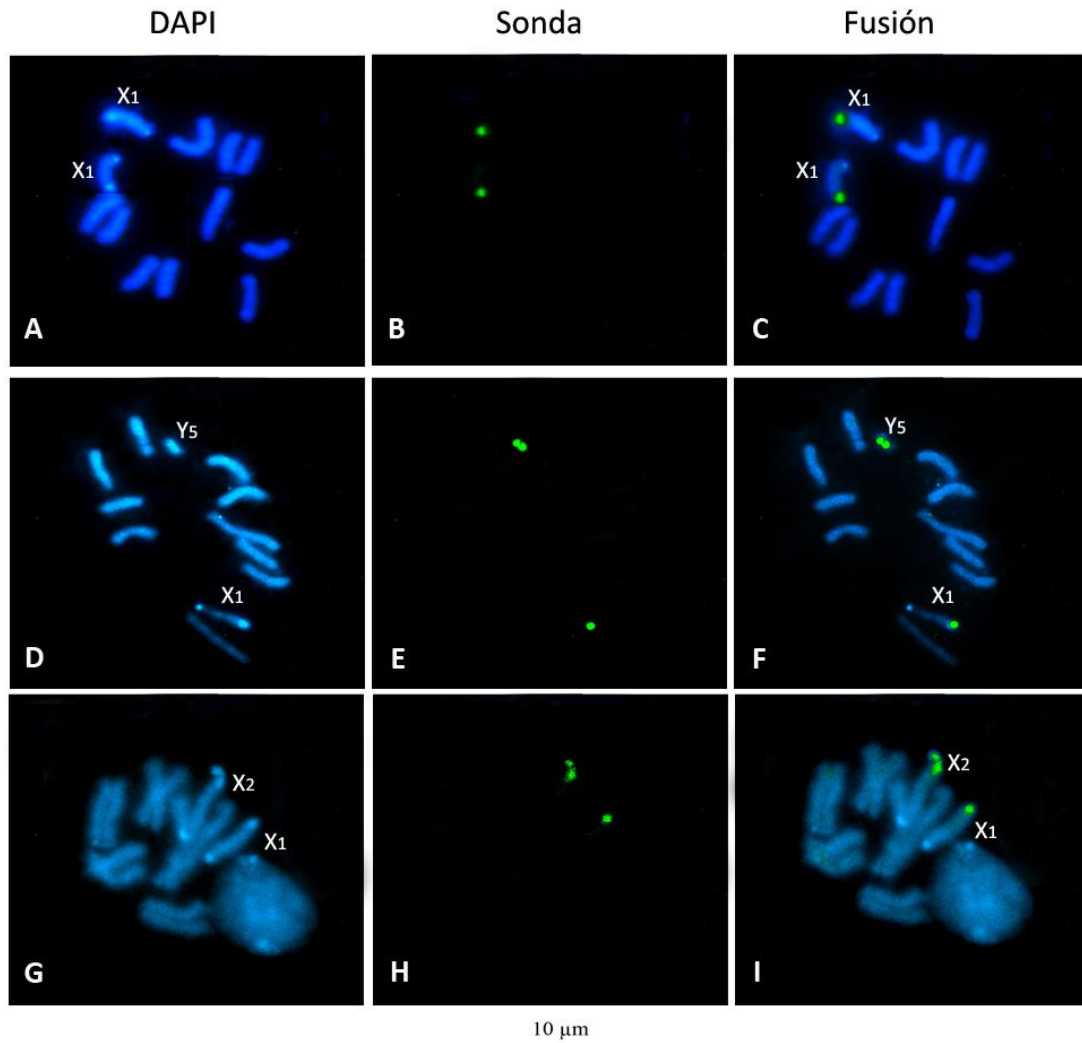


Figura 21: FISH con sonda 18S en metafases mitóticas de *A. fraterculus* sp. 1. A, B y C: hembra X_1X_1 (DAPI, Sonda y Fusión, respectivamente); D, E y F: macho X_1Y_5 (DAPI, Sonda y Fusión, respectivamente); G, H e I: hembra X_1X_2 (DAPI, Sonda y Fusión, respectivamente).

Localización de genes ribosomales en preparados de cromosomas politénicos

Se empleó la sonda utilizada anteriormente en cromosomas mitóticos, para estudiar la localización de los genes ribosomales en preparaciones de cromosomas politénicos mediante FISH (Figura 22). En los 10 preparados estudiados, se observó una señal positiva en una región de morfología granular, no condensada, que se corresponde con los cromosomas sexuales no politenizados (Figura 22 C y F).

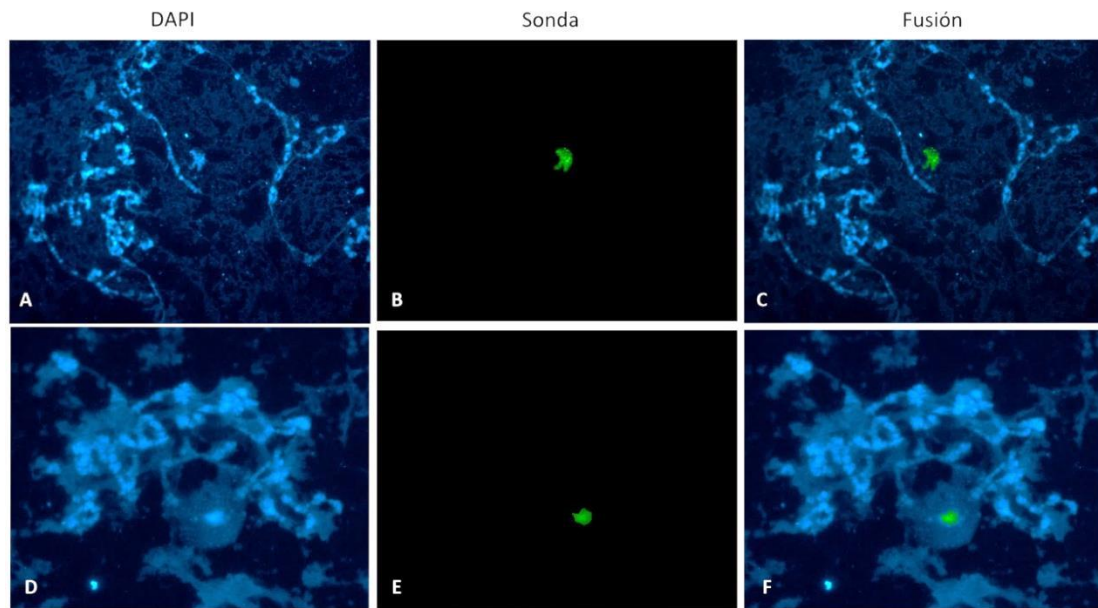


Figura 22: FISH con sonda 18S en cromosomas politénicos de *A. fraterculus* sp. 1. A) Hembra DAPI, B) hembra Sonda C) hembra Fusión, D) macho DAPI, E) macho Sonda y F) macho Fusión. Fusión= imágenes tomadas con los filtros para DAPI y para fluoresceína superpuestas, Giardini et al., 2015.

D1: DISCUSIÓN

Considerando que la citogenética ha desempeñado un papel esencial en los estudios taxonómicos integrados que pretenden aclarar las relaciones entre especies estrechamente relacionadas y/o fenómenos de especiación incipientes (Drosopoulou et al., 2017; Potter et al., 2017; Zacharopoulou et al., 2017), este trabajo de Tesis aborda un estudio citogenético detallado de *A. fraterculus* sp. 1, única entidad biológica o morfotipo del complejo de especies *A. fraterculus* registrado hasta el momento en Argentina y dentro del cual se han reconocido polimorfismos cromosómicos.

El término “especie críptica” se utiliza ahora como sinónimo de lo que Mayr en el año 1942 definió como especies hermanas o, *sibling species* (Mayr, 1942; Singh, 2016). Tales especies se definen como formas simpátricas que son morfológicamente muy similares o indistinguibles, pero que poseen características biológicas específicas, y se encuentran aisladas reproductivamente (Mayr, 1942). Las especies crípticas son muy comunes dentro de los insectos y se encuentran muy bien estudiadas, particularmente aquellas consideradas importantes genéticamente como *Drosophila*, médicamente como los mosquitos *Anopheles* e importantes en términos citológicos como *Sciara* y *Chironomus* (Mayr, 1963, 1970; Singh, 2016). Si bien *A. fraterculus* sp. 1 se enmarca dentro de la problemática que representa la identificación de entidades biológicas en el complejo de especies crípticas *A. fraterculus*, los resultados obtenidos contribuyen con conocimientos sobre aspectos citogenéticos de un miembro de este grupo taxonómico, evidenciando un único representante de esta plaga en nuestro país hallado hasta la actualidad y altamente polimórfico. Estos resultados están disponibles para ampliar el conocimiento intra-morfotipo en el caso de otros miembros del complejo *A. fraterculus*.

D1.1 El Cariotipo mitótico de *Anastrepha fraterculus* sp. 1

El análisis cariotípico de una especie, comienza con el recuento de los cromosomas que portan los individuos a analizar, la identificación de sus cromosomas sexuales (si es posible diferenciarlos) y el estudio de la morfología de cada uno; según la posición de su centrómero (Sumner et al., 1971; Radu et al., 1975). El cariotipo de *A. fraterculus* sp. 1, se compone de cinco pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales. Las hembras de esta especie portan dos cromosomas X y los machos son heterogaméticos, XY (Figura 7). Solamente los cromosomas sexuales presentan heterocromatina, formando importantes bloques (Figura 9). El estudio de la heterocromatina de un organismo, es un aspecto relevante especialmente cuando se analizan especies dentro de complejos de especies (Allshire y Madhani, 2018; Liu et al., 2020). Un ejemplo lo constituye la publicación realizada en el 2006

por Clara Goday y colaboradores, que aborda el problema taxonómico presente dentro del complejo *A. fraterculus* (Goday et al., 2006). Mediante la técnica de bandas C y bandas DAPI/CMA₃, analizaron la heterocromatina de individuos pertenecientes a la sp. 1, sp. 2, sp. 3 y sp. 4 (o morfotipo peruano), del complejo *A. fraterculus*. Específicamente para las sp. 1 y la sp. 3, los cromosomas X poseen la misma distribución de heterocromatina (bandas C), con la misma composición (DAPI positivo y CMA₃ negativo). A su vez, los cromosomas Y de las mismas especies, poseen idéntico patrón de bandas C y bandas DAPI, pero mostraron un patrón de bandas CMA₃ diferente. Es decir que, si se hubiese utilizado solamente la tinción de bandas C para su estudio, no se hubiesen podido diferenciar citológicamente. Este ejemplo es clave, en el caso del complejo *A. fraterculus* y, más aún para nuestro país, donde el único morfotipo que se encontró hasta el presente, tanto en las poblaciones silvestres como en las de laboratorio, es *A. fraterculus* sp. 1.

Debe destacarse que, si bien los cariotipos de las ocho entidades biológicas o morfotipos, previamente identificadas en el complejo *A. fraterculus*, presentan el mismo número total de cromosomas, se diferencian principalmente por el tamaño y el patrón de bandas en los cromosomas sexuales (Hernández-Ortiz et al., 2004; Goday et al., 2006; Hernandez-Ortiz et al., 2012). Asimismo, el cariotipo mitótico de *A. fraterculus* presentado en esta Tesis Doctoral, se encuentra en total concordancia con el detallado por Goday y colaboradores para la sp. 1, como así también con estudios previos realizados en las poblaciones argentinas (Goday et al., 2006; Selivon et al., 2005, 2007; Cáceres et al., 2009; Hernández-Ortiz et al., 2012). Adicionalmente en este trabajo, se estudió el porcentaje que los bloques de heterocromatina representan dentro del cariotipo en estudio (Tabla 3).

Además, se estudiaron nuevamente y con más detalle, las variantes de cromosomas sexuales que se habían descrito en los primeros trabajos realizados en *A. fraterculus* (Lifschitz et al., 1999; Manso y Basso, 1999; Basso et al., 2003), denominadas como X₂ e Y₆, y se realizaron los cariotipos de los individuos que portaban dichas variantes (Figura 8). Estos cariomorfos fueron caracterizados en los primeros trabajos relacionados con la citología de *A. fraterculus* de Argentina (Basso y Manso, 1998; Lifschitz et al., 1999; Basso, 2003), en conjunto con otras variantes cromosómicas, que no fueron observadas durante la realización de esta Tesis.

Hasta el momento, no se han informado variaciones cromosómicas intra-morfotipo en ningún otro integrante del complejo de especies al que pertenece *A. fraterculus* sp. 1. En general, el tamaño de los cromosomas sexuales es variable entre las especies tefritidas (Sharakhov et al., 2014).

D1.2 El complemento politénico de *Anastrepha fraterculus* sp. 1

En las especies del orden Diptera, el análisis citogenético se ha visto facilitado en gran medida por la existencia de los cromosomas politénicos. Como parte de la profundización en el conocimiento citogenético de *A. fraterculus* sp. 1, además de los cromosomas mitóticos, se exploraron los cromosomas politénicos de sus glándulas salivales.

En este trabajo de Tesis, los núcleos de las células de las glándulas salivales de *A. fraterculus* sp. 1, mostraron cinco cromosomas politénicos bandeados, que representan a los cinco pares de autosomas acrocéntricos encontrados en el cariotipo mitótico (Figura 13-18). Este resultado se encuentra en concordancia con los resultados de *A. ludens* (García-Martínez et al., 2009), la especie filogenéticamente más cercana a *A. fraterculus* analizada hasta ahora. Al igual que en los complementos politénicos de las especies integrantes de la familia Tephritidae analizadas hasta el momento, los cromosomas sexuales no forman elementos politénicos, probablemente debido a su replicación insuficiente (revisado en Mavragani-Tsipidou et al., 2014). Los cromosomas sexuales en el núcleo politénico están representados por una red de heterocromatina granular (Figura 12 A y B).

Otra característica común en los tefrítidos es la ausencia de un cromocentro típico donde todos los cromosomas se encuentran conectados a través de sus centrómeros. Esto también se observó en *A. fraterculus* sp. 1 donde las regiones centroméricas se identificaron con dificultad debido a sus cromosomas acrocéntricos. Además, los telómeros mostraron un apareamiento ectópico, fenómeno también observado en varias especies tefrítidas (Mavragani-Tsipidou et al., 1992; Zhao et al., 1998; García-Martínez et al., 2009; Zacharopoulou et al., 2011a; 2011b). Esto está probablemente relacionado con la estructura y la organización molecular de las partes distales de los cromosomas en estas especies.

La disponibilidad de configuraciones de cromosomas tan diversas en las especies que se encuentran dentro del complejo *A. fraterculus*, denota aún más la importancia del estudio de los cromosomas politénicos que ayudaría a dilucidar las relaciones filogenéticas existentes entre ellas.

D1.3 Caracterización de los cromosomas mitóticos y politénicos de *Anastrepha fraterculus* sp. 1 mediante FISH

Cromosomas mitóticos y genes ribosomales

En los primeros estudios de hibridación *in situ* fluorescente en *A. fraterculus*, realizados por Basso y Manso en 1998 utilizando una sonda heteróloga de *Drosophila hydei*, se evidenciaron dos señales positivas y terminales en el cromosoma mitótico X₁. Más tarde Goday y colaboradores en el año 2006, realizaron estudios comparativos en miembros del complejo *A.*

fraterculus utilizando una sonda de *Drosophila melanogaster*, y encontraron en *A. fraterculus* sp. 1 una señal positiva de ADNr que co-localizaba con una banda DAPI-positiva en una posición distal del cromosoma X y una segunda señal en las regiones positivas para DAPI/CMA₃ del cromosoma Y. Años más tarde en nuestro laboratorio, Giardini y colaboradores en los años 2009 y 2015, llevaron a cabo los mismos estudios de ADNr pero utilizando una sonda específica diseñada a partir de una región de ADNr 18S de *A. fraterculus* sp. 1 (Figura 21 y MM1.3.2), obteniéndose los mismos resultados que los obtenidos con la sonda de *D. melanogaster* (Goday et al., 2006). Es decir, que los *clusters* de genes ribosomales en *A. fraterculus* sp. 1 de Argentina, se encontraron en el extremo distal del cromosoma X₁, co-localizando con heterocromatina rica en A-T y en el cromosoma Y₅, co-localizando con la heterocromatina rica tanto en A-T, como en G-C (Figura 21). El mismo resultado se encontró en la variante X₂, estudiada en este trabajo de Tesis.

Si bien el patrón observado en el cromosoma Y₅ se encuentra en concordancia parcial con los observado en otros taxones de insectos, donde los bloques de heterocromatina asociados con los organizadores nucleolares presentaron heterocromatina rica en G-C, los patrones observados en los cromosomas X₁ y X₂, observados en esta Tesis, se contraponen con las referencias de otros taxones (Kuznetsova et al., 2001; 2003; Brito et al., 2003; Golub et al., 2004; Groseva et al., 2004; Nechayeva et al., 2004; Gokhman y Kuznetsova, 2006). Al igual que lo observado en peces y anfibios, posiblemente en los insectos exista una relación entre las regiones heterocromáticas CMA₃+ y el ADNr de los cromosomas que portan regiones organizadoras nucleolares (NOR) activas, y la edad evolutiva (Schmid, 1980; Schmid y Guttenbach, 1988; Souza et al., 2001). En dichos casos las regiones NOR, ricas en G-C, se relacionan con condiciones ancestrales en términos evolutivos. Con respecto a *A. fraterculus* sp. 1, será necesario un análisis molecular más profundo y, que incluya a los demás miembros del complejo de especies, para poder relacionar entre la estructura y la evolución del ADNr.

Cromosomas politénicos y genes ribosomales

Dentro de la familia Tephritidae, a la cual pertenecen tanto *A. fraterculus* sp. 1 como la mosca del olivo, *Bactrocera oleae*, los cromosomas sexuales no se condensan formando elementos politenizados, sino que permanecen como estructuras esponjosas (Zacharopoulou, 1987; Zambetaki et al., 1999; García-Martínez et al., 2009; Giardini et al., 2009; Drosopoulou et al., 2012; entre otros). Este mismo resultado lo obtuvieron Drosopoulou y colaboradores en el año 2012, en su trabajo con sondas de cromosomas sexuales, producto de microdissección en *B. oleae* (Drosopoulou et al., 2012). El presente trabajo de Tesis muestra resultados concordantes con los antecedentes expuestos, evidenciados por el análisis de preparados de los

cromosomas de las glándulas salivales de *A. fraterculus* sp. 1 mediante FISH con la sonda homóloga de 18 ADNr. Los resultados de detección positiva con esta sonda, confirman la presencia de los cromosomas sexuales no politenizados (Figura 22).

Los resultados de los estudios de ambos tipos de cromosomas (mitóticos y politénicos) obtenidos en esta Tesis confirman que el ADN ribosomal reside en las regiones heterocromáticas de los cromosomas sexuales, tendencia que había sido observada previamente en otras especies de insectos (Mandrioli et al., 2011; Drosopoulou et al., 2012; Giardini et al., 2012, 2015; Gaspar et al., 2014). Asimismo, nos permiten confirmar la hipótesis planteada para este objetivo, y continuar con la caracterización de la variabilidad genética que registra este morfotipo en nuestro país.

CAPÍTULO 2

Frecuencia y distribución geográfica de las variantes de cromosomas sexuales identificadas en Argentina.
Caracterización molecular del cromosoma Y de *A. fraterculus* sp. 1.

CAPÍTULO 2: Frecuencia y distribución geográfica de las variantes de cromosomas sexuales identificadas en Argentina. Caracterización molecular del cromosoma Y de *A. fraterculus* sp. 1.

I2: INTRODUCCIÓN

I2.1 Estudios citológicos-poblacionales en insectos

Los factores genéticos y los ecológicos pueden promover la diferenciación o la cohesión de las poblaciones de moscas de los frutos de la familia Tephritidae. La comprensión de estos fenómenos se ha vuelto cada vez más importante para mejorar las estrategias de control en áreas específicas (Wang et al., 2017; Dias et al., 2018; Ruiz-Montoya et al., 2020; Zhou et al., 2020). En el caso de la mosca mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), se cree que el intercambio genético entre poblaciones puede estar asociado con el fruto hospedero e incluso, puede disminuir si existe selección o preferencia por algún hospedero en particular (Ruiz-Montoya y Núñez-Farfán, 2013; Ruiz-Montoya et al., 2020). Algunos estudios realizados con el fin de explorar la estructura de las poblaciones mexicanas de *A. ludens*, concluyeron que, más allá de haber observado un alto grado de variación genética y una estructura poblacional que era consistente con la presencia de subpoblaciones, dichas subpoblaciones no parecían ser una consecuencia directa de las especies de hospederos utilizados ni de su origen geográfico únicamente. Las desviaciones significativas de las frecuencias genotípicas esperadas, sugieren que también la selección sexual, debida a un posible apareamiento no aleatorio, estaría actuando sobre estas poblaciones. Dicha selección, junto con la presencia de cierta heterogeneidad en los ambientes, causada tanto por factores geográficos como por la disponibilidad de plantas hospederas, ha influido en la evolución de las poblaciones de *A. ludens* en esta región de México (Aluja et al., 2009; Molina-Nery et al., 2014; Ruiz-Arce et al., 2015). El mismo fenómeno se ha observado en otras especies de *Anastrepha*, como *A. fraterculus* (Vera et al., 2006) y *A. suspensa* (Boykin et al., 2010). Específicamente, en *A. fraterculus* se ha descrito la presencia de un incipiente proceso de especiación promovido por factores como las diferencias ambientales, las preferencias por las especies hospederas y su distribución geográfica (Morgante y Malavasi, 1985; Hernandez-Ortiz et al., 2012; Rull et al., 2012; Oroño et al., 2013; Cladera et al., 2014; Manni et al., 2015; Gómez-Cendra et al., 2016; Rodríguez et al., 2019; Vilardi et al., 2021; Freilij et al., 2022).

En relación a estudios citogenético-poblacionales, existe información particionada sobre los miembros del complejo de especies crípticas *Anastrepha fraterculus sensu stricto*. En particular *A. fraterculus* sp. 1 es el único morfotipo en el que se han descrito polimorfismos intra-

morfotipo hasta el momento (Basso y Manso, 1998; Basso, 2003; Basso et al., 2003). Además, se han hallado dos variantes de cromosomas X y dos de cromosoma Y que fueron descritas y analizadas en el capítulo 1 y, que coexisten en las poblaciones silvestres y de laboratorio de Argentina (Giardini et al., 2015). Es necesario profundizar en el estudio de estos polimorfismos, de manera de implementar estrategias de control efectivas contra la plaga (Cladera et al., 2014).

12.2 Reproducción sexual, cromosomas sexuales y determinación del sexo.

La reproducción sexual es un rasgo muy antiguo de la vida en la tierra. El sexo, la mezcla de genomas mediante la fusión de gametas, es casi universal para la vida eucariota y abarca una amplia gama de sistemas y mecanismos (Bell, 1982; Bachtrog et al., 2014). En la mayoría de los organismos multicelulares, la reproducción sexual ha llevado a la evolución de gametas femeninas y masculinas de diferente tamaño y, frecuentemente a la evolución de dos sexos separados (Bachtrog et al., 2014). A pesar de que el resultado de la determinación del sexo es conservado, existe un gran número de mecanismos subyacentes que pueden desencadenar el desarrollo de un macho o una hembra (Bull, 1983; Charlesworth, 1996; Bachtrog et al., 2014). En insectos, es la reproducción sexual el mecanismo reproductivo más común y, en general, los individuos son machos o hembras durante toda su vida (gonocorismo) (Normark, 2003; Blackmon et al., 2017).

Los cromosomas sexuales han evolucionado de forma independiente repetidas veces a lo largo de la historia de la vida, incluso en los insectos. Estos cromosomas derivan de autosomas originalmente homólogos que adquirieron un gen maestro, determinante del sexo (Bull, 1983) (Figura 23). Esto genera cromosomas sexuales con una función determinante del sexo, pero con un contenido genético idéntico que permite la recombinación en la mayor parte de sus longitudes (cromosomas sexuales homomórficos) (Blackmon et al., 2017). La acumulación de mutaciones sexualmente antagónicas (mutaciones que resultan ventajosas para un sexo, pero desfavorables para el otro), cerca de la región que determina el sexo, genera presiones selectivas tendientes a reducir o eliminar la recombinación entre los cromosomas sexuales en proceso de diferenciación. Esto aseguraría que el alelo sexualmente antagónico se transmita preferentemente a través del sexo al que beneficia. Una restricción de la recombinación favorece la divergencia funcional y morfológica de los cromosomas sexuales, dando lugar a cromosomas sexuales heteromórficos (Bachtrog, 2013; Blackmon et al., 2017). El cromosoma sexual presente en el sexo homomórfico (X en los sistemas heterogaméticos masculinos, Z en los sistemas heterogaméticos femeninos) todavía puede recombinar en el sexo homogamético y, típicamente, mantiene la mayor parte de su contenido genético ancestral. Sin embargo, el

cromosoma limitado por sexo (Y o W), está completamente protegido de la recombinación. La falta de recombinación disminuye la eficacia de la selección natural en el cromosoma Y/W, y puede conducir a la acumulación de mutaciones deletéreas en muchos, o en la mayoría, de sus genes originales. Esta pérdida en la función genética, a menudo se asocia con una acumulación simultánea de ADN repetitivo, produciendo una degeneración completa del cromosoma Y/W que, en el caso extremo, podría perder todos los genes esenciales y desaparecer por completo (Bachtrog, 2013; Blackmon et al., 2017). El resultado de esta desaparición, conduce a la evolución del sistema de determinación del sexo XO o ZO (Bachtrog, 2013; Blackmon y Demuth, 2014, 2015; Blackmon et al., 2017).

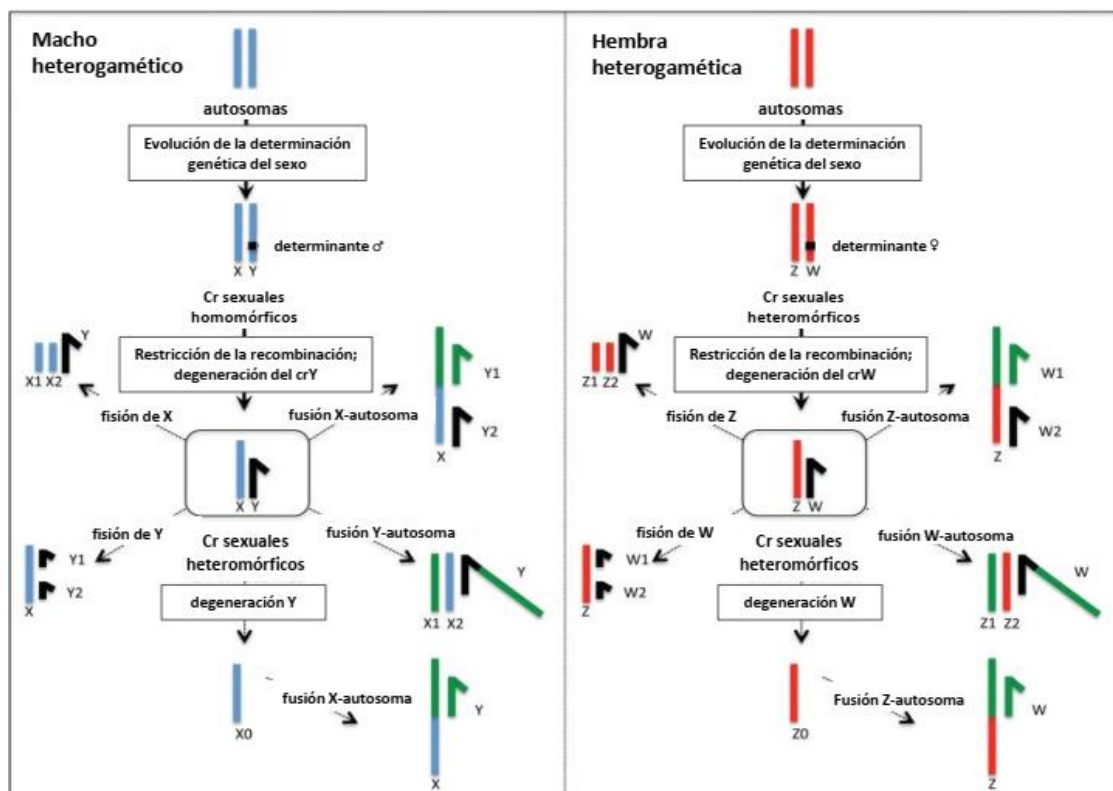


Figura 23: Mecanismo de diferenciación de los cromosomas sexuales a partir de autosomas. Extraído y modificado de Blackmon et al., 2017.

12.3 Mecanismos de determinación del sexo en insectos

La determinación cromosómica del sexo, es el mecanismo de determinación sexual más frecuente entre los insectos. Se basa en diferencias morfológicas existentes entre los cromosomas sexuales que componen el sistema y originan sexos homomórficos y heteromórficos para dichos cromosomas sexuales (XX/XY o ZZ/ZW) (Charlesworth et al., 2005; Blackmon et al., 2017).

Para el sistema XX/XY en general, es el sexo heterogamético el que porta los factores determinantes masculinos en su cromosoma Y. Este sistema es el que describe la

determinación sexual en las moscas tefritidas como *Ceratitis*, *Bactrocera* y *Anastrepha* y moscas de la familia Muscidae (*Musca*), por ejemplo. En estas especies, la hembra representa el sexo homomórfico (XX) y el macho, el sexo heteromórfico (XY) (Figura 24 A). Sin embargo, existen insectos como los lepidópteros (mariposas y polillas), en los cuales el macho es el sexo homomórfico (ZZ) y la hembra es heteromórfica (ZW) (Figura 24 B). En otros órdenes taxonómicos las diferencias entre machos y hembras están dadas por haplo/diploidía (Figura 24 C) y la ausencia de cromosomas sexuales. Por ejemplo, en *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) la determinación del sexo está asignada por la condición alélica (homocigota/heterocigota) de un gen, denominado *complementary sex determiner (csd)*; las hembras son diploides y heterocigotas y los machos son hemi u homocigotas (Beye et al., 2003; Sánchez, 2008).

Generalmente en los insectos, el sexo de un individuo se fija en el momento de la fertilización y la constitución cromosómica del cigoto es una consecuencia directa de la composición cromosómica de las gametas. Ejemplo de ello se observa en géneros del orden Diptera como *Drosophila*, *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* y *Musca* (Bull, 1983; Sánchez, 2008). Sin embargo, en otras especies, la determinación del sexo ocurre por el comportamiento especializado de los cromosomas sexuales durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. La eliminación diferencial de los cromosomas sexuales como mecanismo de determinación del sexo se observa en *Sciara* (Diptera: Sciaridae), en la que todos los cigotos comienzan con la constitución 3X; 2A; la pérdida de uno o dos cromosomas X paternos determina si el cigoto se convierte en 2X; 2A (hembra) o X0; 2A (macho) (Figura 24 D). En los cóccidos (orden Hemiptera), la eliminación diferencial o heterocromatización de todos los cromosomas paternos da lugar a cigotos funcionales diploides o haploides, que se convierten en hembras o machos, respectivamente (Sánchez, 2008).

Finalmente, otro ejemplo de mecanismos de determinación sexual en insectos está dado por factores ambientales. La proporción de sexos de algunas especies de *Sciara* depende de la temperatura a la que se desarrollan los embriones (Sánchez, 2008).

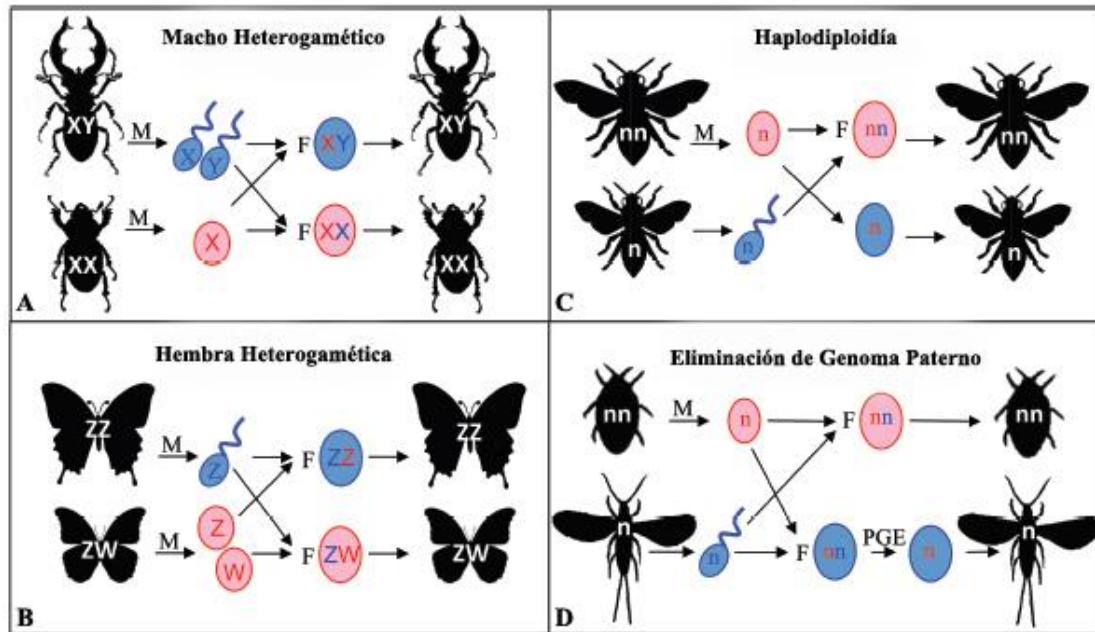


Figura 24: Mecanismos más frecuentes de determinación del sexo en insectos. A) Sistema: macho heterogamético. Los machos presentan cromosomas sexuales heteromórficos (XY) y las hembras son homomórficas (XX). B) Sistema: hembra heterogamética. Aquí, las hembras poseen cromosomas sexuales heteromórficos (ZW), y los machos son homomórficos (ZZ). C) Sistema: haplodiploidía; las hembras se desarrollan a partir de huevos diploides fertilizados (nn) y los machos, a partir de huevos sin fertilizar y haploides (n). D) Sistema de Eliminación del genoma paterno. Los machos se desarrollan a partir de huevos fertilizados, pero eliminan el genoma paterno durante su desarrollo (y se convierten en haploides funcionales). Los espermatozoides se muestran en azul y los óvulos en rojo. M indica meiosis y F indica fertilización. Extraído y modificado de Blackmon et al., 2017.

12.4 Los genes de la cascada de determinación sexual en insectos tefrítidos

La determinación del sexo es un complejo mecanismo molecular que incluye una cascada primaria de genes que regula la expresión de otros genes asociados a los caracteres fenotípicos secundarios del sexo, que incluyen aspectos morfológicos, anatómicos, fisiológicos y de comportamiento. La expresión de genes en cascada, se refiere a la acción de genes ordenada en el tiempo, con la existencia de un factor iniciador que regula la expresión del gen que está por debajo en la cascada y que, a su vez, dicho gen regula la expresión del siguiente (Bopp et al., 2014) (Figura 25).

En insectos tefrítidos, estudios pioneros demostraron que la determinación del sexo, particularmente en *C. capitata*, era diferente de lo hallado en *D. melanogaster* (Willhoeft y Franz, 1996) (Figura 25 A-B). Zapater y Robinson, en 1986, predijeron la presencia de un factor determinante masculino en el brazo largo del cromosoma Y en *C. capitata*, basándose en el análisis de la descendencia aneuploide generada en una línea que portaba una translocación Y-2 (translocación entre el cromosoma Y y uno de los cromosomas del par 2) (Zapater y Robinson, 1986). En 1989, Lifschitz y Cladera encontraron hembras XXX y machos XXY en poblaciones naturales de dicha especie y concluyeron que el cromosoma Y es el que determina

la masculinidad (Lifschitz y Cladera, 1989). Posteriormente los resultados del estudio del mapa de deleciones realizado por Willhoeft y Franz (1996), confirmaron que el brazo largo del cromosoma Y de *C. capitata*, es suficiente para determinar la masculinidad, independientemente de la presencia de dos cromosomas X. Recientemente, Meccariello y colaboradores (2019) mediante estudios genómico-funcionales e hibridación *in situ* describieron la naturaleza y función de un factor inicial en la cascada de determinación del sexo en la misma especie. Los autores describieron una pequeña proteína de expresión temprana (4-8 hs luego de la fertilización), necesaria y suficiente para la determinación de la masculinidad. La mencionada proteína fue localizada mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en el brazo largo del cromosoma Y, en una región cercana al centrómero (Meccariello et al., 2019).

Una vez iniciada la cascada primaria de determinación sexual, el orden de genes es similar al observado en *Drosophila*, aunque en los tefrítidos, el lugar del gen *sxl* es ocupado por el gen *transformer (tra)* (Ruiz et al., 2007) (Figura 25 A-B).

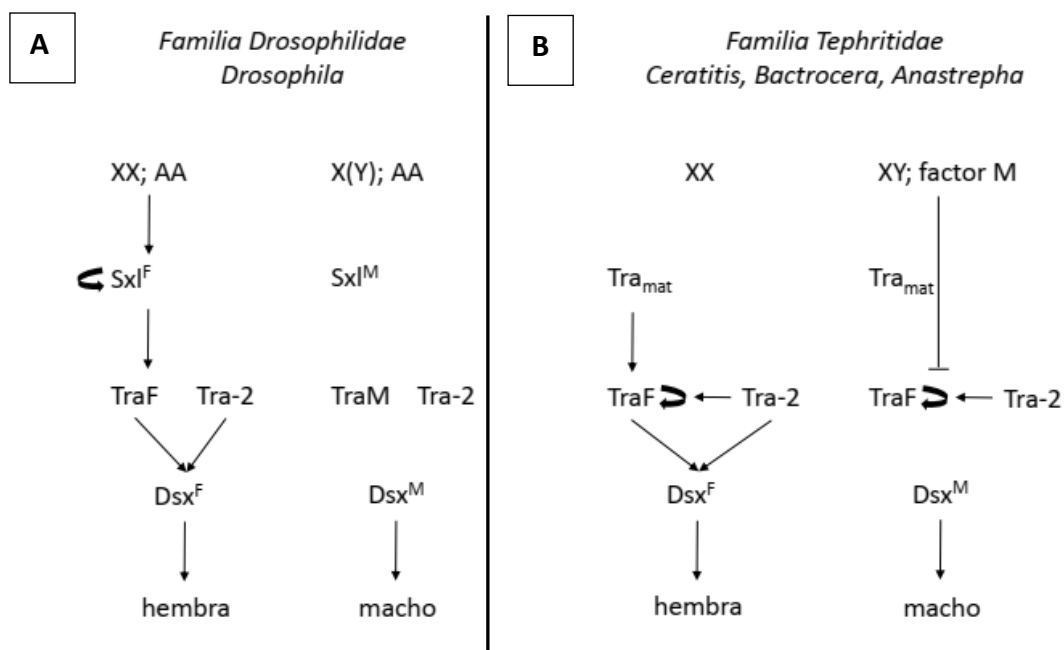


Figura 25: Esquema de la cascada de determinación del sexo en las familias Drosophilidae (A) y Tephritidae (B). Esquema extraído y modificado de Sánchez, 2008.

Como en *Drosophila*, el gen *tra* también controla el *splicing* específico de sexo del transcripto primario de *dsx* (Pane et al., 2002; Lagos et al., 2007; Salvemini et al., 2009). El gen *dsx* se ha caracterizado en los tefrítidos *Bactrocera tryoni* (Shearman y Frommer, 1998), *B. oleae* (Lagos et al., 2005), *B. dorsalis* (Chen et al., 2008), *C. capitata* (Saccone et al., 2008), y en *Anastrepha* (Ruiz et al., 2005; Ruiz et al., 2007). La organización molecular del ORF (*Open Reading Frame* =

marco abierto de lectura) de *dsx* varía entre estos insectos, pero en todos los casos, codifica para proteínas Dsx específicas de machos y hembras que comparten la región N-terminal pero que difieren en sus regiones C-terminales (Ruiz y Sánchez, 2010).

12.5 Estrategias para el estudio de la organización genética de los cromosomas

Se han descrito diversas estrategias para abordar el estudio de la composición de genes de los cromosomas sexuales, incluyendo técnicas citogenéticas, genéticas y genómicas (Wright et al., 2016). La microdissección de regiones cromosómicas o cromosomas completos, es una técnica citológica inicialmente desarrollada para el estudio de cromosomas politénicos de *Drosophila*, como una forma de obtener marcadores de ADN de regiones específicas. Luego, esta técnica se aplicó también a genomas de plantas y mamíferos (Fan, 2002). El desarrollo de los procedimientos de FISH y el establecimiento de la DOP-PCR (Telenius et al., 1992) permitió que las secuencias de ADN obtenidas por microdissección pudieran ser utilizadas como sondas en procedimientos de FISH (a veces denominados micro-FISH). Esta técnica se ha aplicado inicialmente en varios estudios en peces y ha sido particularmente útil en estudios centrados en los cromosomas sexuales en otros organismos, incluyendo a los insectos (Reed et al., 1995; Harvey et al., 2002; Liu et al., 2002). Además de la generación de sondas para FISH, la microdissección proporciona ADN purificado de regiones cromosómicas que puede ser utilizado en investigaciones genómicas que incluyan mapas de ligamiento genético y la generación de bibliotecas de secuencias específicas expresadas en los cromosomas (Zhou y Hu, 2007; Kang et al., 2017).

Dentro de las estrategias genéticas, la utilización de la técnica de AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) permite explorar la presencia de variaciones a nivel del ADN (Vuylsteke et al., 2007). Estos marcadores constituyen una herramienta de análisis en especies poco estudiadas a nivel genómico, dado que combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar (Botstein et al., 1980; Tanksley et al., 1989; Vos et al., 1995; Vuylsteke et al., 2007; ArgenBio, 2017). Esta técnica es potencialmente útil para la búsqueda de polimorfismos o regiones no compartidas entre genomas de individuos de distintos sexos en especies con cromosomas sexuales heteromórficos (Peil et al., 2003; Felip et al., 2005).

OBJETIVOS - Capítulo 2

2- Estudiar la frecuencia y distribución geográfica de las variantes de cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 identificadas en Argentina. Aislar, y caracterizar a nivel de secuencia nucleotídica, regiones cromosómicas específicas de la variante más frecuente de cromosoma Y (Y_5).

2.1: Generar una línea de laboratorio de *A. fraterculus* sp. 1 portadora de la variante Y_5 , cromosoma Y más frecuente y de menor tamaño caracterizado hasta el momento en la especie.

2.2: Estudiar la frecuencia y distribución geográfica de las variantes de cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 y analizar su estructura poblacional, considerando muestras silvestres y de laboratorio de Argentina.

2.3: Microdisecar el cromosoma Y_5 a partir de preparados de cromosomas mitóticos de *A. fraterculus* sp. 1 de individuos provenientes de la línea generada en 2.1 para analizar su composición nucleotídica.

2.4: Analizar el polimorfismo molecular existente entre machos y hembras de *A. fraterculus* sp. 1, mediante la aplicación de la técnica de marcadores moleculares AFLP. Confirmar la especificidad de los fragmentos aislados de las reacciones de AFLP a través de su utilización en preparaciones de cromosomas mitóticos mediante la técnica de FISH y secuenciación.

MM2: MATERIALES Y MÉTODOS

MM2.1: Objetivo 2.1- Generación y mantenimiento de la línea Af-Y chico

Para generar la línea Af-Y chico, portadora de machos que sólo posean la variante Y_5 en su cariotipo, se utilizó un protocolo de purificación a partir de cruzamientos dirigidos de individuos pertenecientes a la línea Af-IGEAF (MM1.1.1). Brevemente, individuos adultos recién emergidos de dicha línea de laboratorio fueron separados por sexo (sexados) para asegurar su virginidad. Posteriormente se formaron 25 familias; cada una de ellas compuesta por un macho y tres hembras de la misma fecha de emergencia. Una vez que los insectos llegaron a su madurez sexual, se juntaron huevos dos veces por semana de cada una de las familias, durante seis semanas para obtener la siguiente generación (F1) correspondiente.

De las familias que dejaron descendencia, se tomaron los datos de cantidad de huevos, larvas, pupas y adultos emergidos (machos y hembras), como parámetros biológicos principales para el establecimiento de nuevas líneas (Jaldo et al., 2001; Mastrangelo et al., 2021). Se midió la supervivencia del estado Huevo-Pupa (HP), como el cociente entre la cantidad de pupas colectadas y el número de huevos depositados por 100 y el porcentaje de emergencia del adulto (%E) que se calculó como el cociente entre el número de adultos emergidos y el número de pupas colectadas por 100. Asimismo, de cada una de las familias se estudiaron citológicamente cinco larvas para identificar el tipo de cromosoma Y que portaban. La elección de la cantidad de larvas a analizar fue fundamentada a partir del objetivo de identificar de manera inequívoca las variantes cromosómicas portadas por cada familia. Adicionalmente, se analizaron de forma independiente, con un modelo lineal generalizado (GLM), si existen diferencias en los parámetros medidos entre las familias portadoras del cromosoma Y_5 o Y_6 . Las diferencias entre los porcentajes "HP y %E" se ajustaron a una distribución Poisson. Todos los análisis se realizaron con la función glmer en el paquete R "lme4" (Bates et al., 2015; R Core Team, 2017).

MM2.2: Objetivo 2.2- Material biológico y estudios poblacionales

- Todos los análisis estadísticos correspondientes a este objetivo, fueron realizados por la Dra. Ma Isabel Remis, Laboratorio de Genética de la Estructura Poblacional, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, IEGEBA (CONICET), FCEyN-UBA.

MM2.2.1 Material Silvestre

La colecta de larvas de *A. fraterculus* sp. 1 provenientes de poblaciones silvestres se realizó a partir del muestreo de frutas infestadas de los diferentes sitios de recolección, que pertenecen a regiones eco-climáticas representativas de las áreas de producción frutal de la Argentina. La

recolección de las frutas se realizó durante tres estaciones consecutivas (2016-2018), en cinco localidades con la colaboración de profesionales pertenecientes al Programa Nacional Frutales (María Elena Schapovaloff, EEA Montecarlo, Misiones), Universidad de Tucumán (Teresa Vera) y SENASA (Marisol Frisolo, La Rioja) (Figura 26):

- Montecarlo, Misiones [(26° 33' 58.32" S 54° 45' 25.2"]; especies frutales muestreadas: guayaba (*Psidium guajava*);
- Horco Molle, Tucumán [(26° 49' 0" S 65° 19' 0" O; especies frutales muestreadas: durazno (*Prunus persica*) y guayaba];
- San Blas de los Sauces, La Rioja [(28° 24' 37.84" S 67° 5' 36.28" O; especies frutales muestreadas: durazno y ciruela (*Prunus domestica*)];
- Concordia, Entre Ríos [(31° 23' 34.66" S 58° 1' 15.2"O; especies frutales muestreadas: durazno y guayaba)];
- Hurlingham, Buenos Aires [(34° 35' 17.92" S 58° 38' 20.58" O; especies frutales muestreadas: durazno y ciruela)].

Las frutas infestadas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ y $70 \pm 10\%$), hasta que las larvas llegaron al 3er. estadio y fueron separadas para hacer los preparados citológicos. La identificación de la especie, fue realizada antes de hacer la disección de la larva siguiendo el protocolo descrito por Frías et al. (2006) basado en el número y morfología de los espiráculos anteriores.

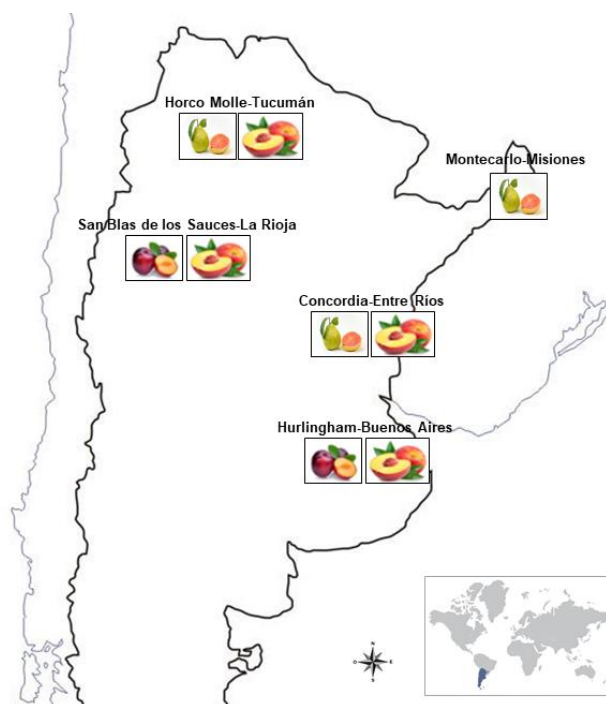


Figura 26: Mapa de Argentina donde se indican los sitios de muestreo y las especies frutales colectadas en cada uno.

MM2.2.2 Líneas de Laboratorio

Se analizaron cuatro líneas de *A. fraterculus* sp. 1 establecidas en el IGEAF (Figura 27):

Línea Af- IGEAF: descrita en MM1.1.1 (Figura 27 A).

Línea Af-Y chico: detalles de su generación y mantenimiento en la sección MM2.1 (Figura 27 B).

Líneas Af-Cast-1 y Af-Cast-2: purificadas también a partir de la línea Af- IGEAF y cada línea es portadora de una cepa de *Wolbachia* diferente (*wAfraCast1_A* y *wAfraCast2_A*, respectivamente). Ambas líneas se mantienen hasta la actualidad (70 generaciones) en condiciones estándares de cría artificial (Conte et al., 2019) (Figura 27 C).

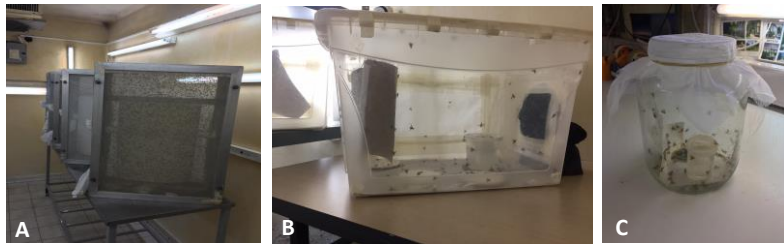


Figura 27: Líneas de laboratorio. A: Jaula Af-IGEAF. B: Jaula línea AF-Y-chico. C: frascos, líneas Af-Cast-1 y Af-Cast-2

MM2.2.3 Análisis poblacionales

A partir de la evaluación de preparados mitóticos de poblaciones silvestres y líneas de laboratorio obtenidos según como se describe en la sección MM1.1.2, se realizó un análisis estadístico poblacional de los polimorfismos hallados para los cromosomas sexuales (denominados aquí como cariomorfos).

Los análisis de frecuencias cromosómicas y de cariomorfos se realizaron utilizando la prueba exacta de Fisher. El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para las variantes del cromosoma X, se caracterizó tanto por la homogeneidad de las frecuencias de las variantes entre los sexos como por las proporciones de Hardy-Weinberg en las hembras. Se verificaron las desviaciones de EHW a través de las pruebas exactas de Fisher, comparando: i) las frecuencias de las variantes del cromosoma X entre machos y hembras y ii) las frecuencias de cariomorfos observadas y esperadas en las hembras. Las pruebas exactas de Fisher y los valores p , se calcularon según Mehta y Patel (1983) y se implementaron en el paquete R (R Core Team, 2017).

La relación entre las frecuencias de las variantes cromosómicas y las variables geográficas (latitud y longitud) en las poblaciones silvestres, se evaluó mediante el análisis del coeficiente de correlación de Pearson en Infostat Professional versión 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

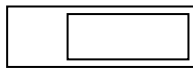
MM2.3: Objetivo 2.3- Microdissección del cromosoma Y₅

La elección de la variante cromosómica a microdisecar (Y₅), se debió a que dicho cromosoma es el más frecuentemente hallado en los individuos estudiados, independientemente de su procedencia. Además, al representar a la variante de cromosoma Y más pequeña descrita hasta el momento, permite una búsqueda más acotada del factor de masculinidad.

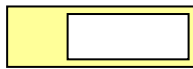
MM2.3.1 Obtención de los preparados de ganglio cerebral

Las disecciones del ganglio cerebral se realizaron con el protocolo habitual, detallado en MM1.1.2. Los individuos disecados (larvas de 3er. estadio) provinieron de la línea obtenida en MM2.1. Los preparados fueron deshidratados en una serie de alcoholes (70 %, 90 % y 100 %), 2 min cada uno, secados al aire y teñidos con Giemsa 5 % (Giemsa diluido con agua corriente) (Bressa et al., 2009; Drosopoulou et al., 2012).

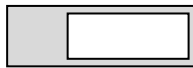
Para la puesta a punto de las preparaciones se evaluaron tres tipos de soporte:



1) Portaobjetos tradicional de vidrio con membrana de polyester.



2) Portaobjetos de plástico, calado en el medio y cubierto con membrana de polyester.



3) Portaobjetos de metal, calado en el medio y cubierto con membrana de polyester.

Para realizar las microdisecciones del cromosoma Y₅ de *A. fraterculus* sp. 1 se probaron dos microdisectores: el primero y el más utilizado para lograr las microdisecciones descritas en esta tesis, fue el microdisector láser Leica Microsystems del DEGE-IEGEB de la FCEyN-UBA (Departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales) y el segundo fue el equipo Láser ArcturusXT que se encuentra en el Servicio de Microdissección Láser IByME-CONICET (Instituto de Biología y Medicina Experimental) (Figura 28 A y B, respectivamente).

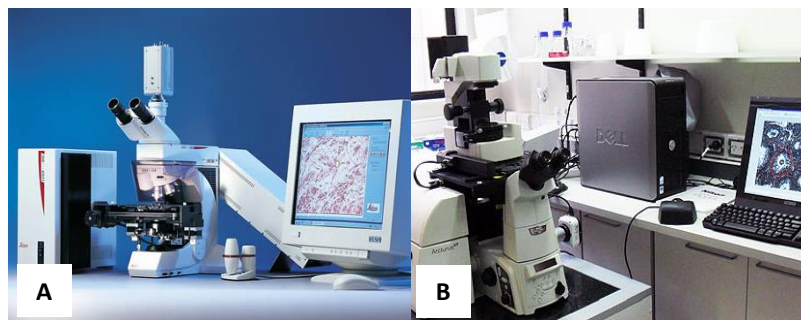


Figura 28: A) Microdissector Leica Microsystems B) Láser ArcturusXT, Life Technologies Applied Biosystems, USA

MM2.3.2 Amplificación, análisis y marcado de los productos de microdissección

Los productos de microdissección obtenidos se amplificaron por DOP-PCR (Telenius et al., 1992) utilizando la enzima *Synergy-Taq* (ThermoFisher Scientific). La reacción de DOP-PCR es una PCR tradicional con oligonucleótidos degenerados que permiten la amplificación de secuencias desconocidas; la enzima utilizada fue de mayor fidelidad que una *Taq* polimerasa convencional.

Componentes de la reacción	Concentración inicial	Concentración final
Buffer 10X (Synergy)	10X	1X
Primers DOP	10 μ M	0,33 μ M
dNTPs mix	10 mM	0,67 mM
Synergy Taq	5 U	0,08 U
ADN (Producto de microdissección)		Volumen según []
H ₂ O ultra pura, Invitrogen hasta completar 30 μ l		

Programa: 94°C 3 min
 94°C 30 s
 58°C 30 s
 72°C 5 min
 93°C 30 s

} 30 ciclos

Las amplificaciones se visualizaron en un gel de agarosa 1 % p/v (en buffer TAE 1X), 75 min a 90V.

La marcación de los productos de microdissección, se realizó por *Nick translation* según Steinberg et al. (2014), con rodamina (fluorocromo rojo) o fluoresceína (fluorocromo verde), según protocolo detallado en la sección MM1.3.2.

MM2.4: Objetivo 2.4- Detección de regiones sexo específicas en *A. fraterculus* sp. 1 mediante AFLP

- Todos los experimentos relacionados con AFLP, se llevaron a cabo en el laboratorio de Cultivos Industriales del Instituto de Genética de INTA, con la supervisión y asesoramiento del Ing. Agrónomo Ms Sci Daniel Díaz y la Ing. Agrónoma Ms Sci Valeria Etchart.

MM2.4.1 Extracción de ADN

En primer lugar, se llevó a cabo una transferencia de la técnica, a partir de protocolos aplicados en plantas, hacia *A. fraterculus* sp. 1, que incluyó la extracción de ADN para luego aplicar la técnica de AFLP. La extracción del ADN se realizó con el protocolo CTAB/cloroformo/octanol detallado en la sección MM1.3.2 (Hoisington et al., 1994).

Para la aplicación de la técnica de AFLP en *A. fraterculus*, se hicieron dos experimentos (ensayo preliminar y segundo experimento). A modo exploratorio, en el ensayo preliminar se formaron 2 *pooles* (uno de machos y otro de hembras) de individuos adultos provenientes de la línea Af-IGEAF. Cada *pool* estuvo formado por cinco adultos. El objetivo de formar *pooles* de individuos y no realizar la extracción de ADN individual, fue evitar la detección de polimorfismos que pudiesen estar presentes solamente en un individuo y que no sean el reflejo, en este caso, de diferencias relacionadas con el sexo, que es el objetivo de este estudio.

Para el segundo experimento, los individuos provinieron de la línea Af-Y chico. En esta ocasión, también se realizaron *pooles* de cinco individuos (hembras y machos separadamente), pero fueron cuatro grupos de cada sexo. Al ampliar la cantidad de *pooles*, además de sumar réplicas, se pueden realizar diversos tratamientos al mismo tiempo. La calidad del ADN fue analizada en un espectrofotómetro Nanodrop 1000© (TermoFisher) y en gel de agarosa 0,8 % p/v como se describe en la sección MM1.3.2.

El índice de pureza del ADN, es un cálculo que realiza el programa del Nanodrop 1000© (TermoFisher), como el cociente entre la absorbancia de la muestra a 260 nm y la absorbancia a 280 nm: $Ip = A_{260}/A_{280}$. La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1,8-2,0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1,6.

MM2.4.2 AFLP

Restricción-ligación

Los procesos de corte con enzimas de restricción del ADN total obtenido y la ligación de los adaptadores para AFLP en los fragmentos digeridos, se llevaron a cabo simultáneamente. De acuerdo con lo propuesto por Vos et al. (1995) y Etchart (2009); para digestión del ADN se

utilizaron dos combinaciones de enzimas de restricción *EcoRI*-*MseI* (combinación 1) y *PstI*-*MseI* (combinación 2), en las cuales una enzima de cada combinación reconoce una secuencia de 6 a 8 pb (*EcoRI* y *PstI*) y la otra reconoce una secuencia de 4 pb (*MseI*) (Figura 29).

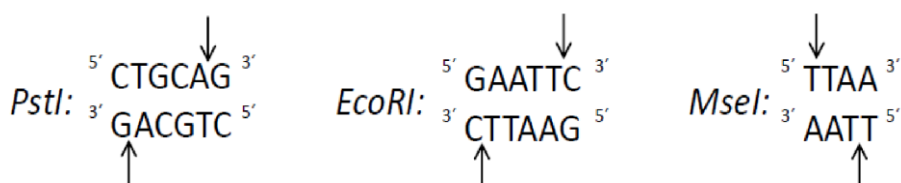


Figura 29: Secuencia nucleotídica de reconocimiento y corte (flechas) de las enzimas de restricción utilizadas.

En la ligación se utilizaron adaptadores específicos de ADN doble cadena, de 20 a 30 pb de longitud que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción y así generan el molde para la amplificación posterior del ADN.

Los productos de la restricción-ligación fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

Componentes de la reacción	Concentración inicial	Concentración final
Buffer Restricción-Ligación (10mM Tris- HAc pH 7,5, 10mM MgAc, 50mM KAc, 5mM DTT, 50 ng/ μl BSA)	5X	1X
<i>PstI</i> ó <i>EcoRI</i>	10 u/ μl	0,2 u/ μl
<i>MseI</i>	10 u/ μl	0,1 u/ μl
T4 ADN Ligasa	5 u/ μl	0,1 u/ μl
ATP	10 mM	0,4 mM
Adaptador <i>PstI</i> o <i>EcoRI</i> (5 μM)	5 μM	0,08 μM
Adaptador <i>MseI</i> (50 μM)	50 μM	0,8 μM
ADN	400 ng/ μl	3,5 ng/ μl
H₂O ultra pura (Invitrogen), hasta completar 20 μl		

Pre-amplificación selectiva (PCR+1)

Una vez ligados los adaptadores se realizó la pre-amplificación, que consiste en utilizar oligonucleótidos complementarios de los adaptadores más una base aleatoria, en su extremo 3' (Etchart, 2009). Se utilizó una combinación de oligonucleótidos para cada combinación de enzimas: E01/ M04 (combinación 1 de enzimas) y P01/ M04 (combinación 2 de enzimas).

E01: 5' GACTGCGTACCAATTCA^{3'}

M04: 5' GATGAGTCCTGAGTAAT^{3'}

P01: 5' GACTGCGTACATGCAGA^{3'}

Componentes de la reacción	Concentración inicial	Concentración final
Buffer	5X	1X
MgCl ₂	25 mM	1,65 mM
Primer E01 o P01	100 ng/μl	6,7 ng/μl
Primer M04	100 ng/μl	6,7 ng/μl
dNTPs mix	10 mM	0,25 mM
Taq Invitrogen (EUA)	5 u/μl	1,25 u/μl
ADN (Producto de la restricción-ligación): 3 μl		
H ₂ O ultra pura, Invitrogen hasta completar 25 μl		

Programa: 94°C	3 min	} 30 ciclos
94°C	30 s	
56°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
10°C	24 h	

Para verificar la amplificación se sembraron 8 μl de una dilución 1/3 de la PCR+1, más 2 μl de buffer de carga, en geles de agarosa 2 % p/v. Los resultados positivos esperados consisten en observar una amplificación positiva y continua de fragmentos de entre 50 y 500 pb.

Los productos de esta pre-amplificación fueron conservados a -20°C hasta su utilización.

Amplificación selectiva (PCR+3)

Para las PCR+3, se utilizó como templado 1 μl de una dilución 1/30 de cada una de las reacciones de PCR+1, en un volumen total de 20 μl.

En esta etapa se utilizan oligonucleótidos que contienen 3 nucleótidos selectivos adicionados en el extremo 3' de la secuencia del adaptador, es decir dos más que los utilizados en la amplificación anterior.

Se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores:

M ₃₁	P ₄₃	M ₃₆	E ₃₂
M ₃₂	P ₃₂		E ₃₃
	P ₃₃		E ₃₆
	P ₄₃		E ₄₀
	E ₄₅		E ₄₁
M ₃₄	P ₄₃	E ₄₂	
M ₉₁	E ₃₃	M ₉₂	E ₃₃
	E ₄₀		E ₄₀

Oligonucleótidos *Mse*I:

M31 GATGAGTCCTGAGTAA~~AAA~~

M34 GATGAGTCCTGAGTAA~~AAT~~

M92 GATGAGTCCTGAGTAA~~TTC~~

M36 GATGAGTCCTGAGTAA~~ACC~~

M91 GATGAGTCCTGAGTAA~~TTA~~

M92 GATGAGTCCTGAGTAA~~TTC~~

Oligonucleótidos *Eco*RI:

E32 GACTGCGTACCAATTC~~AAC~~

E33 GACTGCGTACCAATTC~~AAG~~

E36 GACTGCGTACCAATTC~~ACC~~

E40 GACTGCGTACCAATTC~~AGC~~

E41 GACTGCGTACCAATTC~~AGG~~

E42 GACTGCGTACCAATTC~~AGT~~

Oligonucleótidos *Pst*I:

P32 GACTGCGTACATGCAG~~AAC~~

P33 GACTGCGTACATGCAG~~AAG~~

P43 GACTGCGTACATGCAG~~ATA~~

P45 GACTGCGTACATGCAG~~ATG~~

En esta etapa de la técnica de AFLP, la elección de las combinaciones de cebadores utilizados también fue parte del experimento preliminar. En el mismo se utilizaron: M₃₆-E₃₃/E₄₀/E₄₂, M₃₆-P₃₂/P₃₃/P₄₃/P₄₅, M₃₁/P₄₃, M₃₄/P₄₃ y en el segundo (2do. experimento), se repitieron las primeras tres combinaciones que habían arrojado resultados promisorios y, se agregaron las combinaciones M₃₆-E₃₂/E₃₆/E₄₁, M₉₁-E₃₃/E₄₀ y M₉₂-E₃₃/E₄₀.

Componentes de la reacción	Concentración inicial	Concentración final
Buffer 5X	5X	1X
MgCl ₂ (25 mM)	25 mM	1,5 mM
Primer E	100 ng/ µl	1,5 ng/µl
Primer M	100 ng/ µl	1,5 ng/µl
dNTPs	10 mM	1,67 mM
Taq Invitrogen (EUA)	5 u/µl	0,04 u/µl
Producto de PCR+1 (dilución 1/30): 1 µl		
H ₂ O ultra pura, Invitrogen hasta completar 20 µl		

Programa: 94°C	4 min	} 36 ciclos
94°C	30 s	
61°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
10°C	24 h	

Las reacciones fueron guardadas a una temperatura de -20°C, hasta su utilización.

Separación y visualización de los productos de amplificación

Los productos de la amplificación se separaron en geles desnaturizante de poliacrilamida 6 % (Acrilamida: bisacrilamida 19:1; 7 M urea) de 0,4 mm de espesor, teñidos con Nitrato de plata (NO₃Ag) (Kopps, 1993). Cada producto, se sembró junto con volúmenes variables de formamida.

Una vez revelado el gel, las bandas que amplificaron en machos solamente, fueron purificadas utilizando dos protocolos:

- 1) - Se colocó suavemente una pipeta sobre la banda elegida.
 - Se descargaron ~5 µl de H₂O calidad HPLC y se dejó hidratar unos minutos (el gel se va disolviendo).
 - Se absorbieron los ~5 µl de H₂O HPLC vertidos y se utilizó el ADN extraído, como templado para reacciones posteriores de PCR.
- 2) - Se cortó la banda elegida con un bisturí.
 - Se colocó en un tubo *ependorf* de 2 ml con 20 µl de H₂O calidad HPLC.
 - Se incubó a -80°C durante 10 min y luego a 37°C durante 10 min.
 - Se centrifugó a 17000 g durante 10 min.
 - Se utilizaron 2 µl del sobrenadante, como templado para reacciones posteriores de PCR.

En ambos casos, la re-amplificación del ADN extraído del gel, se realizó mediante PCR, utilizando el protocolo y cebadores descritos para las reacciones de PCR+3 anteriores.

Se midió la concentración y la calidad del ADN extraído de las bandas purificadas del gel de poliacrilamida en Nanodrop 1000© (TermoFisher) y se realizaron las diluciones necesarias para llegar a la concentración requerida para secuenciación por el método de Sanger en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica (IB, INTA, IABIMO-CONICET). Las muestras purificadas fueron enviadas para ser secuenciadas de forma directa utilizando el *primer forward* utilizado en las reacciones de PCR+3.

Las secuencias nucleotídicas se analizaron con el software Staden Package v 1.6-r (Staden et al., 2003). Posteriormente y luego de un editado manual (en el caso de ser necesario), las secuencias finales obtenidas fueron comparadas con aquellas disponibles en las bases de datos del NCBI mediante el algoritmo de Blastn (Altschul et al., 1990).

R2: RESULTADOS

R2.1: GENERACIÓN DE LA LÍNEA Af- Y chico

Para lograr la purificación de una línea de *A. fraterculus* sp. 1 portadora de la variante de cromosoma Y de menor tamaño conocida para esta especie (Y_5), se realizó un *screening* de larvas de 3er. estadio de la línea Af-IGEAF (MM1.1.1). De los 100 individuos estudiados, 57 resultaron hembras, 37 machos y 6 no pudieron ser identificados en cuanto al sexo (Figura 30 A). De los 37 machos encontrados, 8 portaban el cromosoma Y_6 ; lo que indica la presencia de este cromosoma, en un 21,62 % de las larvas macho analizadas. En el caso de las hembras se observó mayoritariamente el X_1 en un 74 % (Figura 30 B).

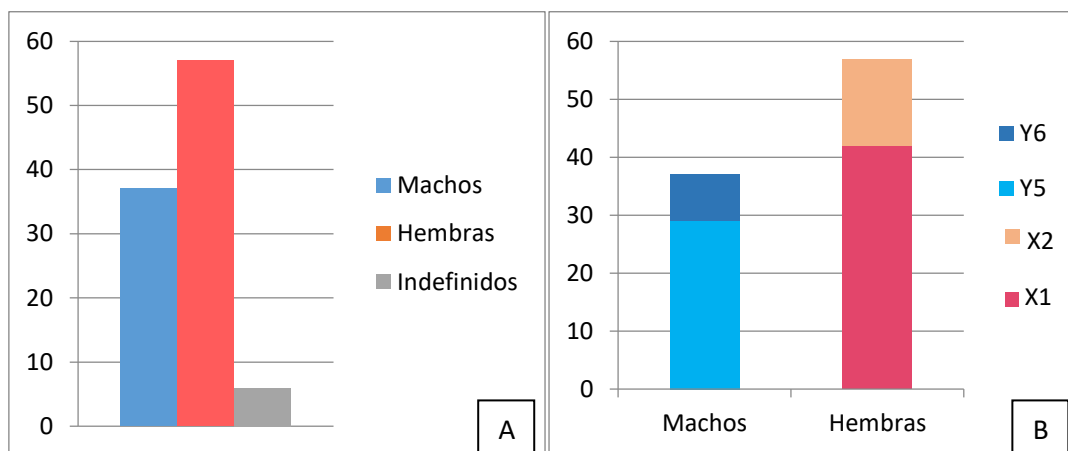


Figura 30: *Screening* de la línea Af-IGEAF. A: proporción de sexos. B: frecuencia de las variantes de los cromosomas sexuales encontradas (X e Y).

De las 25 familias de *A. fraterculus* formadas a partir de la cría experimental de *A. fraterculus* sp. 1 establecida en el IGEAF, 16 dejaron descendencia. En la Tabla 5 se registraron los parámetros biológicos medidos de dichas familias. Particularmente, no se observaron diferencias significativas en los valores de H-P y %E de las familias portadoras de una u otra variante de cromosoma (H-P: $p=0,824$; %E: $p=0,988$). Aunque todas estas mediciones son las utilizadas de rutina en el laboratorio, en el momento de establecer una nueva línea de insectos (Jaldo et al., 2001; Mastrangelo et al., 2021); en este caso particular, los datos citogenéticos (tipo de cromosoma Y), resultaron determinantes y fueron la base de la selección realizada para la purificación de la línea.

Los estudios citológicos de cinco larvas (3er. estadio) de cada familia mostraron que, de las 16 familias, 13 portaron el cromosoma Y_5 y 3 portaban la variante Y_6 . El N de larvas a estudiar de cada una de las familias se estableció en 5, para garantizar un número de metafases aptas para la identificación inequívoca de los cromosomas sexuales presentes en la familia. Todas

aquellas portadoras de la variante de cromosoma Y deseada (Y_5), se juntaron para fundar la línea Af-Y chico.

Esta nueva línea fue el insumo principal para el desarrollo de las actividades correspondientes a los objetivos 2.2 y 2.3.

Tabla 5: Parámetros citogenéticos y biológicos (promedio por colecta) de las 16 familias que dejaron descendencia.

Las celdas marcadas en celeste, indican las familias portadoras del cromosoma Y_6 .

HP= porcentaje de supervivencia estado Huevo-Pupa, calculado como $\#Pupas/\#Huevos \times 100$.

% E=porcentaje de emergencia del adulto, calculado como $\#Adultos/\#Pupas \times 100$

Familia	Huevos	Pupas	Adultos	Cromosoma Y	HP	% E
524	163	114	80	Y_5	69,94	70,17
525	27	19	13	Y_5	70,37	68,42
526	188	132	92	Y_5	70,21	69,70
529	123	86	60	Y_6	69,92	69,77
530	46	32	22	Y_6	69,56	68,75
532	138	97	68	Y_5	70,29	70,10
533	245	172	120	Y_5	70,20	69,77
535	95	67	47	Y_5	70,53	70,15
536	149	104	73	Y_5	69,80	70,19
538	65	46	32	Y_5	70,77	69,56
541	68	48	34	Y_6	70,59	70,83
543	55	39	27	Y_5	70,91	69,23
545	24	17	12	Y_5	70,83	70,59
546	134	94	66	Y_5	70,15	70,21
547	290	203	142	Y_5	70	69,95
548	118	83	58	Y_5	70,34	69,88

R2.2: FRECUENCIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS VARIANTES DE CROMOSOMAS SEXUALES IDENTIFICADAS

R2.2.1 Caracterización de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1- Análisis poblacionales

Resultados de la caracterización cariológica

Se analizaron un total de 424 preparados de cromosomas mitóticos de *A. fraterculus* sp. 1. Los individuos estudiados, provenían de poblaciones silvestres (MM2.2.1) y líneas de laboratorio (MM2.2.2). Se examinaron en promedio, 30 larvas por población excepto en el caso de La Rioja donde sólo se recuperaron 10 individuos (Tabla 6).

Tabla 6: Distribución geográfica de cariomorfos de *A. fraterculus* sp.1. Individuos totales analizados, divididos por población/línea y cariomorfo que presenta cada uno.

Población/Línea	Cariomorfos									Total
	♀				♂					
	X ₁ X ₁	X ₁ X ₂	X ₂ X ₂	Total ♀	X ₁ Y ₅	X ₁ Y ₆	X ₂ Y ₅	X ₂ Y ₆	Total ♂	
Misiones	17	-	-	17	13	-	-	-	13	30
Tucumán	33	1	-	34	28	1	-	-	29	63
La Rioja	4	-	-	4	6	-	-	-	6	10
Entre Ríos	16	3	-	19	19	3	-	-	22	41
Buenos Aires	13	1	-	14	13	2	-	-	15	29
Total	85	5	-	88	79	6	-	-	85	173
Af-IGEAF	41	16	-	57	29	8	-	-	37	94
Af-Y chico	53	2	-	55	45	-	-	-	45	100
Af-Cast-1	13	1	3	17	11	-	4	-	15	32
Af-Cast-2	13	-	1	14	11	-	-	-	11	25
Total	120	19	4	143	96	8	4	-	108	251

Luego del examen citológico de los individuos, se confirmó la presencia de dos variantes de cromosoma X (X₁ y X₂) y dos de cromosoma Y (Y₅ e Y₆) (Figura 31), tanto en las líneas de laboratorio como en las poblaciones silvestres.

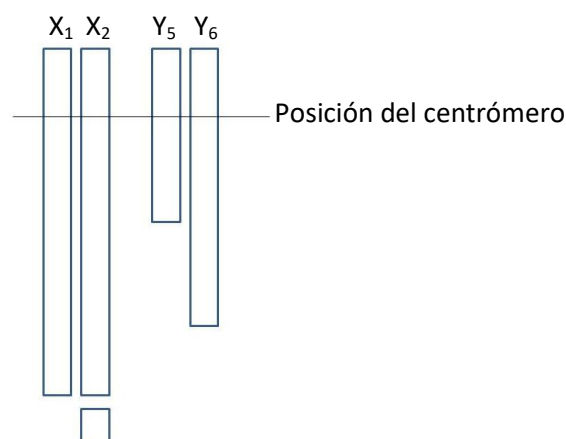


Figura 31: Esquema de los cariomorfos sexuales hallados en las poblaciones analizadas de *A. fraterculus* sp. 1.

En las poblaciones silvestres analizadas, específicamente en La Rioja y Misiones, se encontraron sólo dos combinaciones de cromosomas sexuales (X₁X₁ y X₁Y₅, en hembras y machos respectivamente). En las muestras de Buenos Aires, Tucumán y Entre Ríos, se

observaron cuatro cariomorfos (hembras X_1X_1/X_1X_2 y machos X_1Y_5/X_1Y_6) (Tabla 6; Figura 32 A-E).

Los machos X_2Y_5 , fueron hallados solamente en la línea de laboratorio Af-Cast-1 (Figura 32 F) y las hembras X_2X_2 , fueron encontradas en dos líneas de laboratorio (Af-Cast-1 y Af-Cast-2) (Figura 32 C). No se hallaron machos X_2Y_6 en ninguna de las muestras analizadas (Tabla 6).

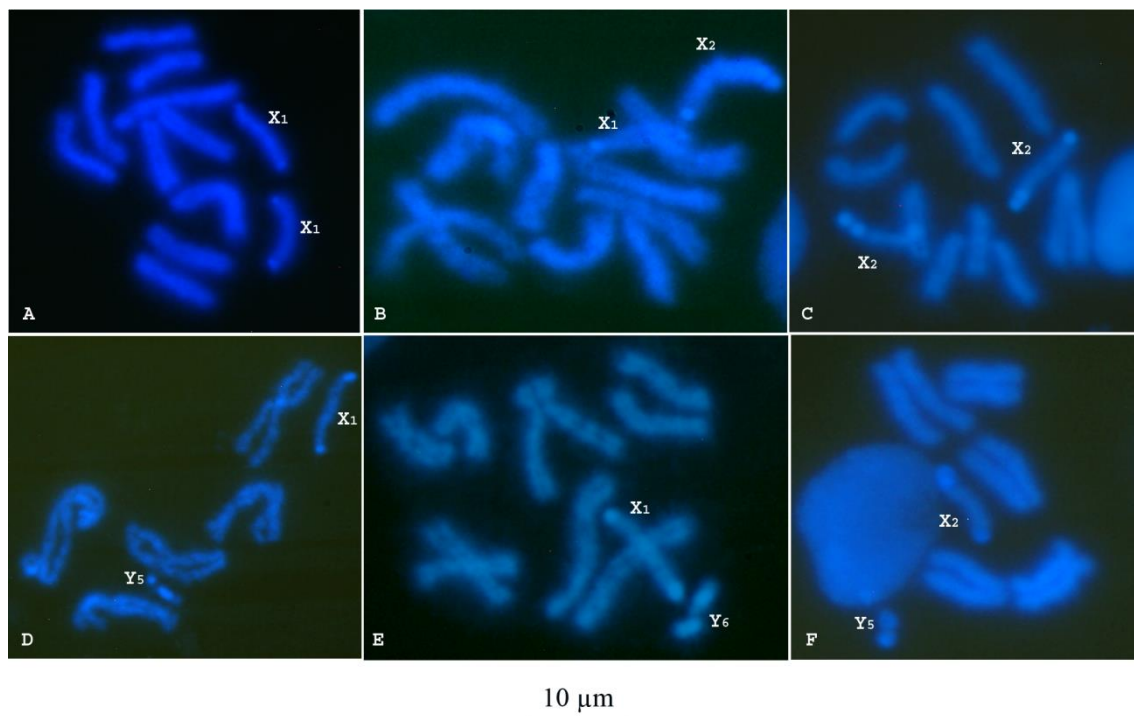


Figura 32: Cariomorfos sexuales detectados en poblaciones silvestres y líneas de laboratorio de *A. fraterculus* sp.1 de Argentina. A-E: Preparaciones citológicas de cromosomas mitóticos, coloreadas con DAPI. A-C: metafases femeninas. D-F: metafases masculinas.

Resultados del análisis estadístico poblacional

No se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de cariomorfos observadas y esperadas, en poblaciones silvestres o cepas de laboratorio (Prueba exacta de Fisher; $p > 0,05$ en todos los casos) (Tabla 7). Además, el análisis de la incidencia de cromosomas reveló homogeneidad de las frecuencias del cromosoma X en ambos sexos en la naturaleza (Prueba exacta de Fisher; $p > 0,05$ en todos los casos). Ambos resultados muestran la existencia de equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de cada población. Tampoco se hallaron diferencias cuando el análisis se realizó tomando en cuenta el fruto hospedero analizado (Figura 26; MM2.2.1).

Análisis de cariomorfos presentes en poblaciones silvestres

Los cariomorfos X_1X_1 y X_1Y_5 se observaron en alta frecuencia en todas las poblaciones silvestres (valores de frecuencia media: 0,94 y 0,93, respectivamente) (Tabla 7). El análisis geográfico de

las variantes cromosómicas, reveló que no existen diferencias significativas entre las frecuencias de X y de Y, en dichas poblaciones (Prueba exacta de Fisher; $p > 0,05$; $p = 0,34$, $p = 0,42$, respectivamente). Además, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de cariomorfos femeninos, en las mismas poblaciones (Prueba exacta de Fisher; $p = 0,2847$).

El análisis de correlación entre las frecuencias de cromosomas de las poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1 y las variables geográficas, latitud y longitud, mostró una asociación negativa significativa entre la frecuencia de Y_5 y la latitud (Correlación de Pearson; $r = 0,88$; $p = 0,0489$). Por el contrario, la frecuencia del cromosoma Y_6 , se incrementó con la latitud (Figura 33).

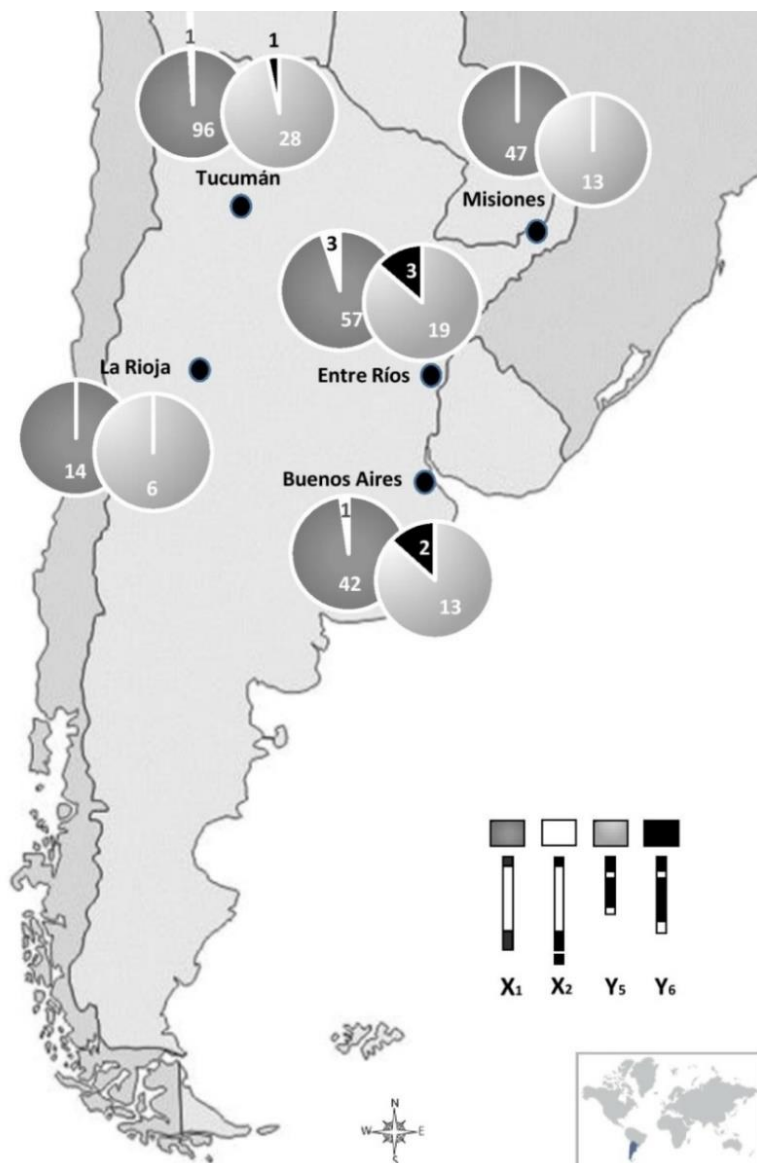


Figura 33: Distribución geográfica y frecuencia relativa de las variantes de cromosomas sexuales detectadas en las poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1. Los números sobre los gráficos de torta, corresponden a la frecuencia absoluta de cada variante cromosómica. Los puntos negros identifican la ubicación de los sitios de muestreo.

Análisis de cariomorfos presentes en líneas de laboratorio

La caracterización citogenética de las cepas de laboratorio, mostró algunas diferencias con respecto a las poblaciones silvestres. Luego del análisis de 94 preparados de cromosomas mitóticos (57 hembras y 37 machos) correspondientes a la línea Af-IGEAF, se observaron frecuencias significativamente más bajas de X_1X_1 (0,72) y X_1Y_5 (0,78) y frecuencias más altas de X_1X_2 (0,28) y X_1Y_6 (0,22) con respecto a las frecuencias totales observadas en muestras silvestres (Tabla 7). De hecho, la prueba de Fisher reveló que la cepa Af-IGEAF exhibe diferencias significativas en las variantes X ($p = 0,0034$), en comparación con su población silvestre de origen (Tucumán). Las diferencias en el cromosoma Y entre las mismas muestras fue marginalmente significativa ($p= 0,06$) (Tabla 7).

En la línea Af-Y chico (purificada a partir de Af-IGEAF, portadora del cromosoma Y_5), el 96 % de las hembras fueron portadoras del cariotipo X_1X_1 y el 4 % X_1X_2 , mientras el 100 % de los machos correspondió al cariotipo X_1Y_5 (Tabla 7). Un importante incremento en la frecuencia de la variante X_1 fue hallada en esta línea, en comparación con la línea de la cual se originó (Af-IGEAF) (Test Exacto de Fisher; $p= 0,0004$) (Tabla 7).

Las líneas Af-Cast-1 y Af-Cast-2 mostraron una distribución diferencial de cariotipos (Tabla 7). Para la línea Af-Cast-1, se detectó la presencia de hembras X_1X_1 (76,5 %), X_2X_2 (17,6 %) y X_1X_2 (5,9 %) y machos X_1Y_5 (73 %) y X_2Y_5 (27 %) (Tabla 7). En Af-Cast-2, se detectaron hembras X_1X_1 (93 %), X_2X_2 (7 %) y no se observaron hembras X_1X_2 . En cuanto a los machos, se detectó un 100 % de individuos X_1Y_5 . Ambas cepas mostraron diferencias significativas en las frecuencias de las variantes de cromosoma X (Test Exacto de Fisher; $p= 0,0328$) (Tabla 7).

Tabla 7: Frecuencias relativas de cariomorfos y variantes cromosómicas en las poblaciones de *A. fraterculus* sp. 1

Población/Línea	Cariomorfos									Cromosomas sexuales					
	♀				♂										
	X ₁ X ₁	X ₁ X ₂	X ₂ X ₂	Total ♀	X ₁ Y ₅	X ₁ Y ₆	X ₂ Y ₅	X ₂ Y ₆	Total ♂	X ₁	X ₂	Total X	Y ₅	Y ₆	Total Y
Misiones	1,00	0,00	0,00	17	1,00	0,00	0,00	0,00	13	1,00	0,00	47	1,00	0,00	13
Tucumán	0,97	0,03	0,00	34	0,97	0,03	0,00	0,00	29	0,99	0,01	97	0,97	0,03	29
La Rioja	1,00	0,00	0,00	4	1,00	0,00	0,00	0,00	6	1,00	0,00	14	1,00	0,00	6
Entre Ríos	0,84	0,16	0,00	19	0,86	0,14	0,00	0,00	22	0,95	0,05	60	0,86	0,14	22
Buenos Aires	0,93	0,07	0,00	14	0,87	0,13	0,00	0,00	15	0,98	0,02	43	0,87	0,13	15
Af-IGEAF	0,72	0,28	0,00	57	0,78	0,22	0,00	0,00	37	0,89	0,11	151	0,78	0,22	37
Af-Y chico	0,96	0,04	0,00	55	1,00	0,00	0,00	0,00	45	0,99	0,01	155	1,00	0,00	45
Af-Cast-1	0,76	0,06	0,18	17	0,73	0,00	0,27	0,00	15	0,78	0,22	49	1,00	0,00	15
Af-Cast-2	0,93	0,00	0,07	14	1,00	0,00	0,00	0,00	11	0,95	0,05	39	1,00	0,00	11

R2.3: MICRODISECCIÓN CROMOSÓMICA

R2.3.1 Microdissección del cromosoma Y_5 de *A. fraterculus* sp. 1

Se evaluó la calidad de 27 preparados citológicos realizados en los diferentes soportes testeados en la sección MM2.3.1. Se utilizaron las preparaciones realizadas con el portaobjetos de plástico y con el portaobjetos de metal, ya que las metafases en estos soportes, fueron más claras, con cromosomas separados y bien definidos, posiblemente evitando el corte de cromosomas de células vecinas. Las preparaciones utilizadas para la microdissección, correspondían a individuos con cariotipo X_1X_1 (hembras) y X_1Y_5 (machos), provenientes de la línea AF-Y chico generada en el Objetivo 2.1.

Se realizaron cuatro eventos de corte donde a partir de 18 preparados y se microdisecaron 47 cromosomas X_1 y 26 cromosomas Y_5 . Cada uno de los tubos *ependorf* donde se colectaron los cromosomas cortados, contaba con 5 μ l de agua HPLC.

En la Figura 34 se muestra una metafase de un individuo macho X_1Y_5 antes y después del corte del cromosoma Y_5 .

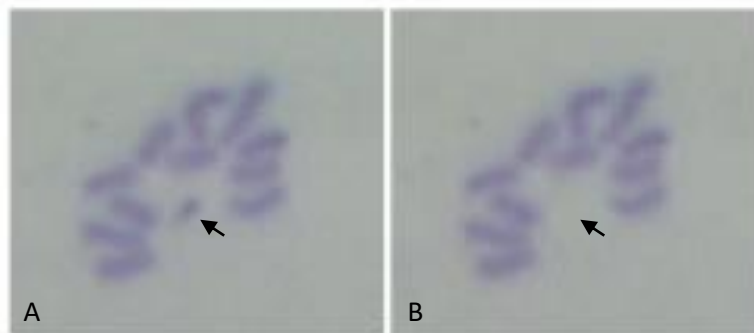


Figura 34: Metafase de un macho X_1Y_5 , antes y después del corte. A= metafase antes de la microdissección, B= metafase luego de la microdissección.

Amplificación y marcado de los productos de microdissección

Se amplificó mediante DOP-PCR el material cromosómico de los cuatro tubos que contenían cromosomas Y, y los cuatro que contenían cromosomas X. El resultado positivo se observó como un rango continuo de bandas de entre 300 y 600 pb en la corrida en el gel de agarosa 2 % p/v.

Dos muestras conteniendo el cromosoma Y, se marcaron con rodamina (fluorocromo rojo) y las otras dos, con fluoresceína (fluorocromo verde), según el protocolo detallado en la sección MM1.3.3. Todas las reacciones de marcación fueron satisfactorias. El resultado positivo se observó como un retraso en la corrida en el gel de agarosa con respecto del control. Dicho

control es el mismo producto de microdissección previo a la reacción de marcado. El retraso en la corrida se produce por la diferencia de peso molecular que genera el fluorocromo utilizado. Los cuatro tubos que contenían los cromosomas X cortados, se guardaron a -20°C para ser usados en reacciones futuras.

FISH utilizando las sondas generadas por microdissección

En la Figura 35 se esquematiza la manera en que se desarrollaron los experimentos de FISH. Como se observa en el esquema, dentro del mismo preparado, se marcaron dos zonas, en una de ellas se aplicó la sonda control (sonda de ADNr 18S de *A. fraterculus* sp. 1, sección MM1.3.3) y en la otra zona, la sonda de cromosoma Y microdisecado; de esta manera se asegura que el tratamiento del vidrio es el mismo, siendo la única diferencia la sonda utilizada en cada región.

Se obtuvieron resultados positivos con la sonda control en todos los experimentos de FISH, se observó la cantidad y distribución de secuencias 18S esperadas. En cambio, todos los resultados fueron negativos con respecto a la sonda de cromosoma Y obtenida por microdissección, sin haberse observado hibridización alguna con la sonda utilizada.

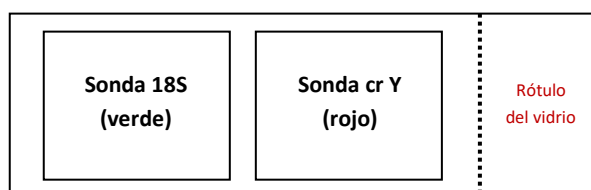


Figura 35: Esquema que muestra la disposición de las sondas para los experimentos de FISH realizados.

R2.4: ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO MOLECULAR ENTRE MACHOS Y HEMBRAS

R2.4.1 AFLPs en *Anastrepha fraterculus* sp. 1

Experimento preliminar

En la Tabla 8 se registraron los valores de calidad y concentración de las muestras de ADN de los dos *pools* de moscas utilizados para el experimento preliminar, estimados con Nanodrop 1000©. Dichos parámetros se midieron también en una corrida electroforética en gel de agarosa 0,8 % p/v (Figura 36).

Tabla 8: Medición de calidad de las muestras de ADN obtenidas.

Muestra	[] ng/ μl	260/280	260/230
♂	290,27	1,95	2,14
♀	325,45	1,92	2,15

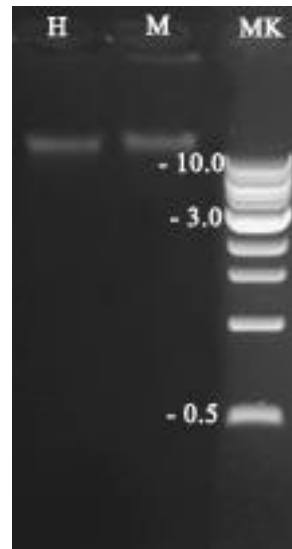


Figura 36: Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % p/v de muestras de ADN *pool* de individuos adultos de *A. fraterculus* sp. 1. H= *pool* de hembras, M= *pool* de machos, MK= Quik Load Purple 1 Kb DNA ladder.

Las muestras de ADN obtenidas, fueron utilizadas para aplicar la técnica de AFLP en busca de regiones/bandas diferenciales entre sexos. Para ello, primero se realizó la restricción-ligación de las muestras de ADN y posteriormente, una pre-amplificación selectiva (PCR+1) (sección MM2.4.2).

Para la realización de las amplificaciones selectivas (PCR+3), se utilizaron las combinaciones de cebadores o *primers* +3: M₃₆-E₃₃/E₄₀/ E₄₂ (sección MM2.4.2).

Los productos de la amplificación se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6 % p/v, según el protocolo detallado en la sección MM2.4.2. Se identificaron ocho bandas presentes solamente en los machos con un tamaño de alrededor de 200 pb. Las mismas se cortaron del gel (sección MM2.4.2), se re-amplificaron utilizando la misma combinación de *primers* usada para la PCR+3, se purificaron y se enviaron a secuenciar. En la Figura 37 se muestra un extracto de un gel de poliacrilamida 6 % p/v, donde se corrieron las PCR+3 de 1 *pool* de hembras (H) y 1 *pool* de machos (M), junto con bandas diferenciales identificadas, eluidas y purificadas.

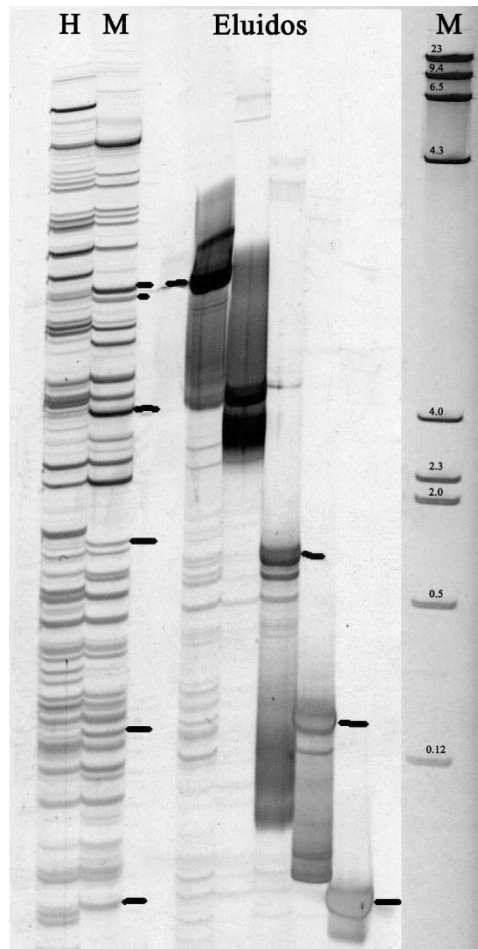


Figura 37: Fotografía de una sección de un gel de poliacrilamida 6 % p/v-PCR+3 con la combinación de cebadores M36-E42. Las bandas diferenciales se marcan con un guión. H= *pool* de hembras, M= *pool* de machos, Eluidos= bandas diferenciales, M= marcador LambdaDNA/HindIII.

Comprobación de especificidad

Las bandas diferenciales purificadas fueron posteriormente secuenciadas. Se obtuvieron cuatro secuencias nucleotídicas de un tamaño promedio de 182 bases potencialmente específicas de machos (Figura 3-Anexo). El análisis de Blastn contra la base de datos de genomas de tefrítidos (Whole-genome shotgun contigs - wgs: Tephritidae TaxID: 7211), mostró similitudes significativas para la secuencia AfE6 (150 b). Esta secuencia tuvo un 70 % de similitud con una secuencia no identificada del ensamblaje del genoma completo de *Zeugodacus cucurbitae* cepa USDA-PBARC White Pupae (Sequence ID T1JRNW01006185.1 contig006185, whole genome shotgun sequence) (Figura 4-Anexo). A partir de una búsqueda específica de la secuencia de *Z. cucurbitae* (142 b) contra la bases de datos nt (Blastn), se halló un 97 % (138/142 nt comparados) de similitud con el transposon Batmar11 descrito en *Bactrocera tryoni* (Sequence ID: KX931004.1) (Figura 5- Anexo).

Segundo experimento

Se extrajo el ADN total de cuatro *poles* de machos y cuatro *poles* de hembras adultos-virgenes provenientes de la línea Af-Y chico generada como parte del objetivo 2.1; de forma de tener la seguridad de que todos los machos analizados portan el cromosoma Y₅. Al ampliar la cantidad de *poles* de cada sexo se están realizando réplicas simultáneas, lo cual incrementa las posibilidades de la detección de bandas sexo-específicas. La calidad y la concentración de las muestras obtenidas se observó en un gel de agarosa 0,8 % p/v (Figura 38). En cada una de las calles se observa una banda única de ADN que demuestra su calidad. Por otro lado, su alto peso molecular se evidenció mediante la comparación con el marcador de peso molecular Lambda/*Hind*III (Fermentas). Las mediciones realizadas con Nanodrop 1000© (Tabla 9), muestran también la alta concentración y pureza de las muestras (ver sección MM2.4.1).

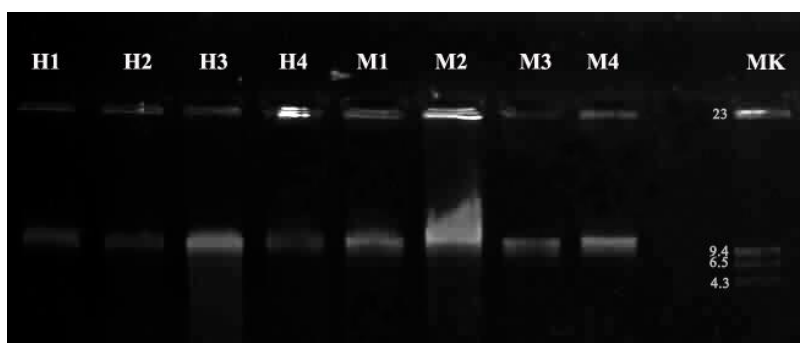


Figura 38: Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % p/v de la extracción de ADN del segundo experimento. H= *pool* de hembras, M= *pool* de machos, MK= Lambda/*Hind*III; la calle entre M4 y MK, no fue utilizada.

Tabla 9: Medición de calidad de las muestras de ADN obtenidas.

Muestra	[] ng/μl	260/280	260/230
H1	328,9	1,75	0,72
H2	394,9	1,74	0,74
H3	380,9	1,80	0,78
H4	314,3	1,81	0,77
M1	389,2	1,73	0,78
M2	132,2	1,72	0,68
M3	114,1	1,69	0,58
M4	185,8	1,68	0,65

De la misma manera que en el experimento preliminar, las muestras de ADN obtenidas (8 *poles* en total), fueron utilizadas en la técnica de AFLP. Primero se realizó la restricción-ligación de las mismas y posteriormente, la pre-amplificación selectiva (PCR+1) (detallada en la

sección MM2.4.2). Las reacciones de PCR+1, se corrieron en un gel de agarosa 2 % p/v junto con un marcador de 50 pb (Figura 39). Como se observa en la Figura 39, el resultado positivo de la pre-amplificación selectiva, se observa como un rango continuo de bandas de diferente tamaño.

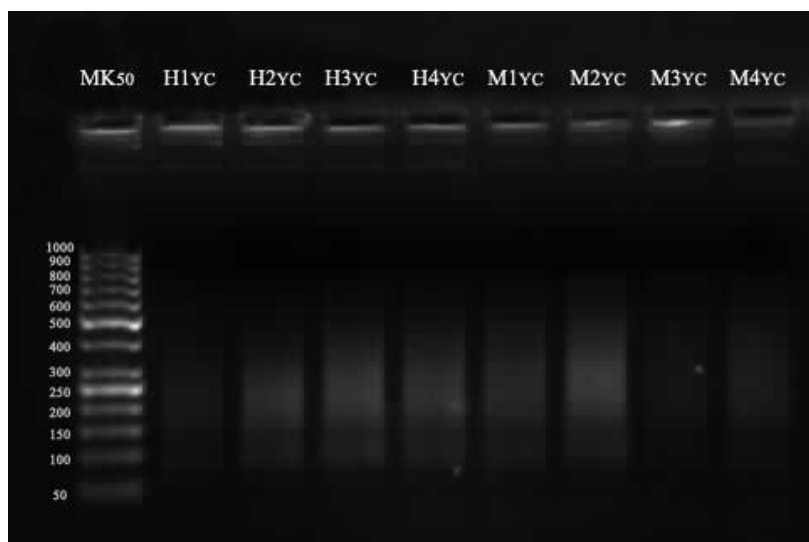


Figura 39: Electroforesis en gel de agarosa 2 % p/v de muestras PCR+1 realizada luego de la digestión del ADN con las enzimas E01 y M04 (AFLP) correspondientes al segundo experimento. La primera calle corresponde al marcador 50 pb (Thermo Fisher Scientific) las cuatro calles siguientes, corresponden a los cuatro *pools* de hembras de la línea Af- Y chico (H1_{YC}, H2_{YC}, H3_{YC} y H4_{YC}) y las últimas cuatro calles, corresponden a los cuatro *pools* de machos de la línea Af- Y chico (M1_{YC}, M2_{YC}, M3_{YC} y M4_{YC}).

Para la realización de las amplificaciones selectivas (PCR+3), se repitieron las combinaciones de *primers* del experimento preliminar (M₃₆-E₃₃/E₄₀/ E₄₂) y se testearon siete combinaciones nuevas (M₃₆-E₃₂/E₃₆/ E₄₁; M₉₁- E₃₃/ E₄₀ y M₉₂-E₃₃/ E₄₀).

Los productos de la amplificación se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6 % p/v (protocolo detallado en la sección MM2.4.2). Una vez revelado el gel, se realizó el *scoring* en un archivo Excel, de la manera que se observa en la Tabla 1 del Anexo. El registro de los datos se tomó de manera binaria, donde 0 indica ausencia y 1 presencia de banda o fragmento. De cada gel se indican los individuos analizados, las bandas de cada una de las calles y si esa banda se ve simple o doble; mostrando, además la combinación de *primers* +3 utilizados para la amplificación.

De las diez combinaciones de cebadores utilizadas en la PCR+3, ocho permitieron identificar un patrón de bandas claro para todas las muestras analizadas. A partir de las corridas electroforéticas, se identificaron un promedio de 18 fragmentos amplificados por cada combinación (dentro de un rango de 10-27), con un tamaño de producto de amplificación desde los 100 a los 400 pb.

Se obtuvieron un total de 181 bandas nítidas, claras y reproducibles, de las cuales casi el 77 % correspondieron a fragmentos variables entre muestras, sin embargo, no se encontraron bandas específicas de sexo; por lo tanto, no se lograron reproducir los resultados del experimento preliminar.

D2: DISCUSIÓN

En este capítulo estudiamos la distribución geográfica de las variantes de cromosomas sexuales en las poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1, representantes de diferentes regiones agroecológicas de nuestro país. Estas regiones muestran características diferenciales de clima, geografía, actividades agrícolas y de paisaje. Mientras que en las regiones del oeste las plantaciones de frutales se encuentran en valles fértiles entre montañas y cerros, con un clima subtropical seco y cálido, en las regiones del este se presentan en una extensa llanura con clima subtropical; mostrando la gran diversidad de ambientes de nuestro extenso territorio (Ministerio del Interior y Transporte, 2014, 2018). A partir de estos resultados, en este capítulo también incluimos la caracterización citogenética de las líneas fundadas y mantenidas en nuestro laboratorio. Estos estudios permitieron profundizar el conocimiento citogenético del morfotipo 1 de *A. fraterculus* presente en Argentina y, además, abordar el estudio molecular de los cromosomas sexuales en esta especie. Para ello, se utilizaron las técnicas de microdissección cromosómica y AFLP. Los resultados preliminares nos permitieron reformular las actividades y proponer otro tipo de estudios de citogenética molecular para continuar profundizando la estructura de los cromosomas sexuales de esta especie.

D2.1 Generación de la línea Af-Y chico

La generación de líneas de insectos seleccionados a partir de alguna característica particular, en este caso una variante cromosómica específica, siempre es una tarea laboriosa. Particularmente en el caso de la purificación de la cepa Af-Y chico, 25 familias fueron estudiadas desde el punto de vista de sus parámetros biológicos y a nivel citogenético. De acuerdo al análisis estadístico realizado a través de GLM (H-P: $p=0,824$; %E: $p=0,988$), no se observan diferencias significativas entre las familias portadoras del cromosoma Y_5 o de la variante Y_6 para las variables H-P (supervivencia Huevo-Pupa) y %E (% de emergencia del Adulto). Estos resultados nos permiten concluir que poseer una u otra variante de cromosoma Y, no estaría confiriendo ninguna ventaja ni ningún perjuicio al macho portador de la misma, ni a su descendencia. A partir de estos resultados, comprendemos la necesidad de realizar más estudios sobre la distribución de frecuencias de las variantes de cromosomas sexuales, en *A. fraterculus* sp. 1 para explicar por qué las variantes de cromosomas sexuales pueden coexistir en frecuencias diferentes sin alterar, en principio, el fitness del individuo que la porta. Además, sería importante evaluar si las frecuencias que se están observando actualmente en las poblaciones naturales, se mantienen en el tiempo o si existen fluctuaciones y, si estas fluctuaciones, ocurren al azar o siguiendo algún tipo de patrón. Una primera exploración a estos aspectos de genética de poblaciones se muestra en la siguiente sección.

D2.2 Caracterización de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 - Análisis Poblacionales

Análisis de frecuencias cariotípicas y cromosómicas en poblaciones naturales

La caracterización citogenética de las poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1 permitió la identificación de cuatro clases de individuos portadores de diferentes combinaciones de cromosomas sexuales (cariomorfos): hembras X_1X_1 y X_1X_2 y machos X_1Y_5 y X_1Y_6 . No se encontraron hembras X_2X_2 ni machos X_2Y_5 y X_2Y_6 (Figura 32). Estos resultados fueron ligeramente diferentes a los previamente reportados, que describieron la presencia de cuatro variantes de cromosoma X (X_1 , X_2 , X_3 , X_4) y seis tipos de cromosomas Y (Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 , Y_5 , Y_6) (Lifschitz et al., 1999; Manso y Basso, 1999; Basso et al., 2003; Basso, 2017; Basso et al., 2019). Estas diferencias pueden ser debidas al momento en que se realizaron los muestreos y la localización de las poblaciones (las referencias previamente citadas informan variantes detectadas en un único muestreo realizado en el año 1999, en Montecarlo - Misiones).

El análisis de las frecuencias cromosómicas y cariotípicas de las poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1 no mostró diferencias entre las localidades estudiadas, pero evidenció una tendencia significativa en la distribución diferencial de las frecuencias cromosómicas (Tabla 7). En particular, se observó una correlación negativa para la distribución del cromosoma Y_5 según la latitud indicando un posible cambio de frecuencias cromosómicas asociado a eventos de colonización, dispersión y demográficos que podrían influenciar la dinámica metapoblacional de la especie (Vilardi et al., 2021; Freilij, 2022; Freilij et al., 2022). El fenómeno de dispersión podría señalarse como causa central, o primera causa a tener en cuenta, para profundizar en los estudios de dinámica ecológica y evolutiva de las poblaciones de *A. fraterculus*. Si bien, aún no existen estudios similares en los demás morfotipos integrantes del complejo, el mencionado fenómeno podría tener diversas consecuencias para el flujo de genes y la demografía (Clobert et al., 2012; Travis et al., 2013; Saastamoinen et al., 2018).

Considerando el hecho de que la especie bajo estudio se encuentra dentro de un complejo de especies crípticas, resulta de gran importancia realizar este tipo de estudios citológicos y poblacionales, fundamentalmente para brindar información en cuanto a la diferenciación de entidades biológicas dentro del complejo de especies, y determinar la presencia de cruzamientos híbridos entre formas cariológicamente diferentes (White, 1973; Polukonova y Belyaina, 2002; Gokhman y Kuznetsova, 2006).

Análisis de frecuencias cariotípicas y cromosómicas en poblaciones de laboratorio

Con respecto al estudio de los cariotipos de las colonias de *A. fraterculus* sp. 1 previamente establecidas en el laboratorio del IGEAF, se observó que la cepa Af-IGEAF mostró diferencias significativas en la distribución de combinaciones cromosómicas en comparación con la frecuencia actual de la población silvestre fundadora (Tucumán). Esto podría deberse a los efectos de selección y deriva génica que impulsan cambios en las frecuencias cariotípicas y cromosómicas, bajo un proceso de cría artificial (Parreño et al., 2014). Procesos similares han sido descritos previamente para esta *A. fraterculus* sp. 1 y otras especies de tefrítidos durante la adaptación al laboratorio (Gilchrist et al., 2012; Parreño et al., 2014; Zygouridis et al., 2014). De hecho, las otras tres cepas de laboratorio analizadas aquí mostraron frecuencias sesgadas de variantes cromosómicas, como se esperaba para este tipo de colonias de laboratorio, fundadas a partir de la cepa Af-IGEAF (Tabla 7). Por otro lado, los resultados del análisis de las cepas de *A. fraterculus* Af-Cast-1 y Af-Cast-2, mostraron dos cariomorfos no detectados en poblaciones silvestres (X_2X_2/X_2Y_5) y que tampoco habían sido observados en estudios previos. Estos resultados demuestran la viabilidad de los mencionados cariomorfos minoritarios, que pudieron ser evidenciados debido a procesos estocásticos que influenciaron las frecuencias de estas variantes de cromosomas sexuales en una colonia con tamaño poblacional reducido. A su vez, no se observaron machos X_2Y_6 en ninguna de las colonias y/o poblaciones silvestres analizadas, hecho explicado principalmente por la baja frecuencia cromosómica de la variante Y_6 detectada en ellas. A pesar de haber demostrado estadísticamente que las poblaciones de esta especie de mosca se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg para las variantes cromosómicas detectadas, estos cariomorfos ausentes, o menos frecuentes, en individuos adultos y sus posibles incompatibilidades cromosómicas asociadas con la presencia de *Wolbachia* necesitan de análisis más detallados de cruzamientos dirigidos, incluido el análisis de parámetros como la fecundidad y la supervivencia larvaria, según se evaluaron previamente en otras especies de insectos (Lassy y Karr, 1996; Tram y Sullivan, 2002; Landmann et al., 2009; Beckmann et al., 2017). Se ha relacionado a *Wolbachia*, por ejemplo, con la feminización de los machos de algunas especies de insectos y crustáceos (como chicharritas y bichos bolita) (Asgharian et al., 2014; Badawi et al., 2018) y también se la ha visto vinculada con eventos de aberraciones sexuales que influyen en la determinación sexual de algunos insectos (Kageyama y Traut, 2004). Si bien todavía no se la ha relacionado directamente con ninguno de estos fenómenos en *A. fraterculus* sp. 1, se han obtenido los primeros resultados que indican ausencia de aislamiento pre y post-cigótico y la existencia por ejemplo de mecanismos biológicos asociados a la matanza de machos, producto de la interacción entre *Wolbachia* y *A. fraterculus* sp. 1 (Conte et al., 2019; Devescovi et al., 2019).

La información disponible con respecto a la distribución de los morfotipos de *A. fraterculus* en América del Sur y los estudios citológicos realizados anteriormente, en conjunto con los resultados aquí descritos, pueden ayudar a plantear algunas hipótesis sobre la introducción y dispersión de *A. fraterculus* sp. 1 en el territorio argentino. Estudios recientes propusieron un posible origen no monofilético de *A. fraterculus* en América del Sur. La expansión de esta especie a diferentes regiones del continente sudamericano puede haberse iniciado por dos rutas de invasión inconexas: un brazo se extendería a lo largo del borde occidental, incluidas las áreas de tierras altas y bajas de la región andina, y el otro a lo largo de la costa este de Brasil (Selivon et al., 2005a; Hendrichs et al., 2015; Mengual et al., 2017). En este sentido, consideramos que el morfotipo 1 brasileño de *A. fraterculus* (hembras X_1X_1 y machos X_1Y_5) pudo haber ingresado a Argentina por el noreste (Misiones) desde Brasil. Este movimiento es el esperado para este morfotipo de *A. fraterculus*, debido a la proximidad geográfica y, se evidencia por un cariomorfo conservado, descrito previamente para *A. fraterculus* de Argentina por Selivon et al., (2005) y Goday et al., (2006) para *A. fraterculus* de Brasil. Otra probable ruta de invasión sería por el noroeste del país (Jujuy-Tucumán), por *A. fraterculus* peruana. El cariotipo peruano fue descrito por primera vez por Cáceres y colaboradores en el año 2009 y es similar al descrito anteriormente para el morfotipo ecuatoriano (Goday et al., 2006). El análisis citológico del morfotipo peruano mostró cromosomas sexuales de similar longitud, denominados Xp e Yp. El cromosoma Xp tiene un bloque heterocromático intersticial prominente, mientras que el cromosoma Yp tiene un bloque positivo para DAPI ubicado en la región centromérica del cromosoma (Cáceres et al., 2009). En nuestro análisis de 173 individuos de *A. fraterculus* sp. 1 pertenecientes a poblaciones silvestres argentinas, no observamos cariomorfos similares a los descritos para el morfotipo peruano. Además, la información disponible actualmente no proporciona suficiente evidencia citogenética para describir posibles eventos de hibridación entre los morfotipos Brasil 1 y peruano, como los descritos previamente por Selivon y colaboradores en los años 1999 y 2005 y Cáceres y colaboradores en el 2009, mediante cruces controlados en laboratorio; pero se podrían hipotetizar teóricamente.

Si bien los resultados que se muestran aquí apoyan la propuesta de un origen único de *A. fraterculus* sp. 1 en Argentina, nos conducen a descartar una de nuestras hipótesis de la existencia de mayor variabilidad genética en las poblaciones silvestres de esta especie comparadas con las poblaciones bajo cría artificial, tema ampliamente discutido y justificado en los párrafos anteriores. Además, apoyan el planteo de un análisis citogenético adicional (que incluya las poblaciones de Brasil y los países del oeste de América del Sur), junto con estudios genéticos y morfológicos. Dicho análisis, podría contribuir a nuestro conocimiento

sobre la dinámica de la variabilidad encontrada, las potenciales rutas de invasión de esta plaga en Argentina y nos ayudarían a plantear posibles hibridaciones entre los diferentes morfotipos integrantes del complejo *A. fraterculus*.

A partir de los conocimientos generados en esta primera sección, se seleccionó a la línea AF-Y chico para continuar con los estudios de caracterización molecular del cromosoma Y_5 .

D2.3 Microdissección del cromosoma Y_5

La microdissección cromosómica se ha valido de los avances tecnológicos en el campo de la citogenética y se ha acoplado con otras técnicas que mejoraron aún más su aplicación (Zhou y Hu, 2007). En citogenética, la microdissección láser se ha utilizado para aislar cromosomas completos o partes de cromosomas (He et al., 1997; Hobza et al., 2004, 2015; Thalhammer et al., 2004; Drosopoulou et al., 2012). Particularmente, en este trabajo se ha empleado esta técnica con el objetivo de aislar el cromosoma Y_5 para obtener secuencias de ADN específicas de dicha variante, y así comenzar a explorar su homología con especies taxonómicamente relacionadas y su posible función. Como se describió en la sección de resultados de esta Tesis, si bien se lograron amplificar por DOP-PCR los productos de microdissección y marcarlos con fluorocromos, cuando se utilizaron como sondas en reacciones de FISH, no se obtuvieron resultados positivos; no habiéndose observado hibridización con la sonda utilizada. El control de los ensayos realizado con la sonda de ADNr 18S, mostró el resultado esperado de hibridación en ambos cromosomas sexuales. En este contexto, luego del análisis de cada uno de los pasos del proceso, y teniendo en cuenta la baja eficiencia que posee la técnica de microdissección, se concluye que los microdisectores utilizados no fueron adecuados para este material en particular. El microdisector del IByME (ArcturusXT, Life Technologies Applied Biosystems) es apto para el corte de células enteras, y el equipo del DEGE (FCEyN-UBA) (Leica Microsystems), si bien posee las características apropiadas para realizar cortes de cromosomas individuales, posee un láser cuya intensidad probablemente haya quemado por completo el cromosoma disecado (al igual que el material cromosómico ubicado alrededor). Esto podría ir en detrimento del proceso de amplificación por DOP-PCR cuya enzima, la *Thermo sequenase* o la *Synergy Taq* (dependiendo el caso utilizado), se vale de parámetros de funcionamiento de muy baja especificidad, para permitir una primera amplificación sin la necesidad de contar con *primers* específicos de la región de interés (y desconocida). Estas características hacen al proceso de amplificación, particularmente susceptible a la obtención de material espurio. Al mismo tiempo, el mecanismo de decantación de los fragmentos microdisecados en el tubo de recepción, presente en el modelo de microdisector Leica utilizado, no aseguró el correcto ingreso de todos los cromosomas cortados. En conjunto, estos factores pudieron llevar a la

obtención de: a) amplificación y marcación de material no proveniente de los cromosomas disecados; b) degradación y/o modificación química del material cromosómico por efecto de la pulverización con el corte del láser, y luego amplificación y marcación de material “impuro”; c) una combinación de ambas. De todas maneras, y aun no habiendo obtenido resultados promisorios en este objetivo, se considera que la aproximación por microdissección es adecuada, y se continuarán realizando experimentos recurriendo a la colaboración de investigadores especializados en laboratorios donde la técnica se realice de manera rutinaria en insectos para la obtención de sondas del material cromosómico deseado.

El proyecto propuesto incluye un abordaje integral citogenético de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, de manera de aislarlos para secuenciar el cromosoma Y₅ en busca del factor M determinante de la masculinidad en la especie. Como alternativa a los estudios de microdissección, se propusieron ensayos de amplificación de regiones específicas del cromosoma Y₅ mediante el uso de la técnica de AFLP.

D2.4 AFLPs en *A. fraterculus* sp. 1

Las principales ventajas que muestra la técnica de AFLP, entre ellas: su replicabilidad, su resolución y su facilidad de uso, fueron los motivos principales por los cuales se decidió aplicar en *A. fraterculus* sp. 1 (Vos et al., 1995; Mueller y Wolfenbarger, 1999; Savelkoul et al., 1999). Además, esta herramienta molecular nos permitía trabajar sin conocimientos previos de secuencia genómica y, en el momento de realizar los experimentos, no existían secuencias conocidas de ADN para *A. fraterculus* sp. 1.

La estrategia para abordar el estudio molecular mediante AFLP fue a través de un experimento preliminar (y exploratorio), en el cual se lograron obtener bandas diferenciales entre machos y hembras que, se aislaron y se secuenciaron. Sin embargo, estas secuencias de ADN obtenidas no evidenciaron similitud en las bases de datos (NCBI) con genes o regiones genómicas asociadas a la determinación del sexo, este resultado no es llamativo, dada la diversidad a nivel de secuencia de ADN de estas regiones genómicas y la falta de información en especies relacionadas, particularmente sobre secuencias de ADN específicas del cromosoma Y. Con el fin de confirmar los resultados de diferenciación entre sexos, observado en el ensayo preliminar y, analizando un mayor número de pools de individuos de cada sexo, se realizó un segundo experimento que mostró resultados contradictorios. No se lograron obtener bandas de AFLP características y asociadas al sexo usando esta aproximación. Existen algunos aspectos técnicos de la metodología utilizada que nos permiten justificar la falta de detección de regiones específicas de sexo en nuestros experimentos. Por un lado, la actividad de las enzimas de restricción pudo verse afectada por la presencia de modificaciones post-traduccionales que

pueden impedir la digestión de una determinada secuencia y su posterior amplificación. Por otro lado, la técnica de AFLP tiene limitaciones en la detección de regiones diferenciales, dado que depende del reconocimiento de las enzimas de restricción utilizadas que reconocen secuencias específicas en el ADN, con la consecuente reducción de las regiones genómicas a detectar. Además, la utilización y análisis de esta técnica, implica una reducción de las regiones genómicas en estudio por la selección de fragmentos amplificados de un rango específico de tamaño (100 a 600 pb), en el cual se comparan las muestras y se detectan los fragmentos diferenciales. Inicialmente el diseño de los ensayos realizados pareció adecuado, sin embargo, no se lograron identificar regiones genómicas diferenciales. Existen en la actualidad, varias alternativas robustas para explorar regiones específicas en el cromosoma Y, siendo las técnicas de secuenciación de genomas completos o particularmente la secuenciación del cromosoma Y mediante el uso de la tecnología Illumina con lecturas largas o PACBio (Papanicolaou et al., 2016; Meccariello et al. 2019; Bayega et al., 2020). Asimismo, otras técnicas de citogenética como la hibridación *in situ* de genomas (GISH) (Xu et al., 2016) y la hibridación genómica comparativa (CGH) (Kallioniemi et al., 1992) han demostrado ser de gran utilidad para el estudio comparativo a nivel de los cromosomas y en particular, explorar las diferencias moleculares entre los cromosomas sexuales en especies heterogaméticas (Traut et al., 1999). En función de lo expuesto, en el siguiente capítulo, nos abocamos a estudios citogenéticos comparativos para continuar la caracterización de las variantes del par sexual en *A. fraterculus* sp. 1.

CAPÍTULO 3

Composición molecular de los cromosomas sexuales de A.

fraterculus sp. 1 de Argentina

CAPÍTULO 3: Composición molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 de Argentina

13: INTRODUCCIÓN

Cromosomas sexuales, FISH, GISH y CGH

La determinación cromosómica del sexo fue descrita por primera vez por Nettie Stevens en 1905, quien observó en los gusanos de la harina (Coleoptera: Tenebrionidae) que las células masculinas portaban un cromosoma más pequeño que el resto, mientras que las células femeninas portaban todos los cromosomas del mismo tamaño (Stevens, 1905). Otros investigadores tuvieron hallazgos similares en la misma época, pero propusieron a las influencias ambientales como la causa principal de lo observado (Wilson, 1906), mientras que Stevens continuaba apoyando la interpretación de que el sexo estaba determinado genéticamente (Furman et al., 2020).

Los cromosomas sexuales han evolucionado independientemente muchas veces durante la vida eucariota, y representan un caso notable de convergencia evolutiva, donde cromosomas sexuales no relacionados comparten características entre taxones distantes (Bachtrog et al., 2014; Wright et al., 2016; Furman et al., 2020). La información sobre estos cromosomas fue aumentando y hoy se conocen detalles de los pasos generales involucrados en su evolución (Charlesworth et al., 2005; Kaiser y Bachtrog, 2010; Ellegren, 2011; Wright et al., 2016; Abbott et al., 2017; Ponnikas et al., 2018). Sin embargo, las fuerzas evolutivas que impulsan la diversidad de mecanismos de determinación del sexo, son poco comprendidas aún, y la mayor parte del conocimiento se basa en la biología de los cromosomas sexuales de unas pocas especies modelo como *Drosophila melanogaster* (Bull, 1983; Bachtrog et al., 2014; Vicoso y Bachtrog, 2015).

El modelo clásico supone que los cromosomas sexuales surgen de un par de autosomas tras la adquisición del locus maestro determinante del sexo (Bull, 1983; Charlesworth, 1991; Bachtrog et al., 2014). La selección sexualmente antagónica favorece la supresión de la recombinación entorno a la región asociada a la determinación del sexo, que puede extenderse a todo el cromosoma (Ohno, 1967; Charlesworth et al., 2005; Wright et al., 2016; Charlesworth, 2017; Sember et al., 2020; Vigoder et al., 2021). La falta de recombinación provoca un aumento de la divergencia genómica entre los cromosomas homólogos y el cromosoma asociado con el sexo heterogamético degenera gradualmente. Este proceso finalmente conducirá a la formación de cromosomas sexuales morfológicamente diferentes (heteromórficos).

Los sistemas XY se originarían cuando el locus de determinación del sexo es el que determina la masculinidad ("factor M"), mientras que los sistemas ZW se originarían a partir de un factor genético determinante femenino ("factor F") (Charlesworth, 1991; Kaiser y Bachtrog, 2010; Wright et al., 2016; Furman et al., 2020; Vigoder et al., 2021). En este sentido, el grado de diferenciación de los cromosomas sexuales dentro del sistema de determinación sexual, podría pensarse como un continuo que va desde las especies con homología completa (que se espera en sistemas sexuales recientemente establecidos), hasta una diferenciación cromosómica casi completa (encontrada por ejemplo en mamíferos y aves), que podría correlacionarse con el tiempo de divergencia de las especies involucradas (Charlesworth et al., 2005; Palmer et al., 2019; Furman et al., 2020; Vigoder et al., 2021).

Si bien los sistemas cromosómicos de determinación sexual son generalmente estables, en la actualidad se conoce que las transiciones dentro de los diferentes grupos taxonómicos son más comunes de lo que se pensaba (Kaiser y Bachtrog, 2010; Bachtrog et al., 2011; Ashman et al., 2014; Blackmon y Demuth, 2015; Vicoso y Bachtrog, 2015; Abbott et al., 2017; Blackmon et al., 2017; Dupim et al., 2018; Jeffries et al., 2018; Pennell et al., 2018). Las variaciones en el sistema sexual de un linaje tienen importantes implicancias evolutivas y ecológicas, afectando el mantenimiento de la variación genética, el grado de endogamia y la tasa de adaptación a ambientes nuevos. Dichas alteraciones, generan consecuencias a largo plazo para la formación de nuevas especies y/o aumentando el riesgo de extinción (Ashman et al., 2014).

El desarrollo de las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) brindó la posibilidad de abordar el estudio de la composición molecular de los cromosomas de un organismo, a través de la detección de la homología existente entre dos secuencias de ADN, una utilizada como sonda y la otra como blanco (Pinkel et al., 1986). La particularidad de este grupo de técnicas consiste en ofrecer simultáneamente la posibilidad de detección de la homología de secuencia y de conocer su localización cromosómica en el blanco. La hibridación *in situ* genómica (GISH), es una técnica de hibridación derivada de FISH, que utiliza como sonda el ADN genómico completo de un individuo marcado con algún fluorocromo (Xu et al., 2016). Se la ha utilizado con éxito en la identificación del cromosoma W de diferentes especies de lepidópteros, para resolver la constitución de los sistemas múltiples de cromosomas sexuales en hembras de la misma especie y en la estimación de relaciones filogenéticas tanto en plantas como en animales (Markova et al., 2007; Zhou et al., 2008), entre otros ejemplos.

Uno de los desarrollos más significativos en la tecnología FISH, fue la introducción de la hibridación genómica comparativa (CGH) en 1992 (Kallioniemi et al., 1992). Esta técnica fue desarrollada inicialmente para el análisis citogenético-molecular de tumores sólidos humanos y, con el tiempo, su uso se ha extendido a estudios evolutivos y descriptivos en diferentes

especies, incluyendo a los insectos (Toder et al., 1998; Traut et al., 1999; Dunham et al., 2002; Sahara et al., 2003; Neusser et al., 2005; Pinkel y Albertson, 2005; Dávila-Rodríguez et al., 2009; Gosálvez et al., 2010; Nieves et al., 2010; Fantini et al., 2011; Yu et al., 2012). Se basa en la hibridación de dos genomas completos, marcados con fluorocromos diferentes y utilizados como sondas (Figura 40) y su utilidad radica en evidenciar las diferencias y las similitudes entre los genomas en estudio en un solo experimento, las cuales no podrían detectarse con la aplicación repetida de otras técnicas de citogenética molecular. Si bien está dirigida a resaltar las diferencias de ADN, no requiere un conocimiento previo de la composición de secuencia y no está restringida a un grupo específico de organismos (Traut et al., 2001).

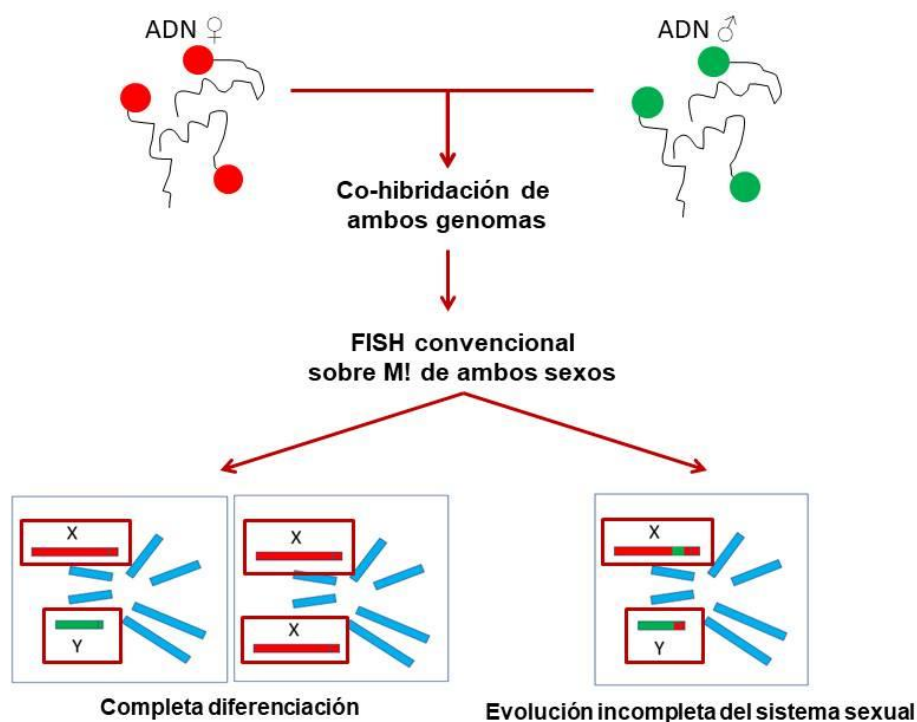


Figura 40: Principios de la técnica de CGH. Extraído y modificado de Fantini, 2015.

Cuando la técnica de CGH es empleada en el análisis de la composición molecular del cariotipo de un organismo con sistema de determinación sexual XY, el cromosoma Y se marca preferentemente con la sonda masculina, los cromosomas X con la sonda femenina y los autosomas muestran una señal equilibrada. Observaciones de este tipo, denotan una completa diferenciación de los cromosomas sexuales de la especie en estudio y se deben a la presencia de una sola copia del cromosoma X en el genoma masculino y dos copias en el genoma femenino (Traut et al., 2001; Baker y Wilkinson, 2010; Landeen y Presgraves, 2013; Sember et al., 2020). Por otra parte, si los cromosomas sexuales que se están estudiando, no se diferencian por completo desde el punto de vista molecular, podrían existir por ejemplo,

señales positivas de sonda femenina en el cromosoma Y de la especie o viceversa y, de esta manera, evidenciar una evolución incompleta del sistema sexual (Landeem y Presgraves, 2013). También se ha demostrado que el CGH es un método confiable y ventajoso para identificar cromosomas sexuales homomórficos, así como para delimitar a gran escala, regiones cromosómicas específicas del sexo en cromosomas sexuales de diferente edad evolutiva (Traut et al., 2001; Vítková et al., 2007; Šíchová et al., 2015; Sember et al., 2018, 2020; De Moraes et al., 2019).

En este trabajo de Tesis, las características referidas a la técnica de CGH fundamentan su elección como metodología de análisis de la composición molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, como alternativa a la utilización de las técnicas de microdissección cromosómica y AFLP.

OBJETIVO - Capítulo 3

- 3-** Analizar la composición molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 mediante técnicas de GISH y CGH.
-

MM3: MATERIALES Y MÉTODOS

MM3.1: Objetivo 3- Citogenética molecular: GISH y CGH en preparaciones de cromosomas mitóticos

MM3.1.1 Material Biológico

El material biológico utilizado para la realización de este objetivo, provino de las líneas establecidas en nuestro laboratorio y detalladas en MM1.1.1 y MM1.2.1.

MM3.1.2 Generación de las sondas para GISH y CGH

Disección de larvas de *A. fraterculus*

Se disecaron larvas en estadio 3 de *A. fraterculus* para la obtención del ganglio cerebral para realizar los preparados de cromosomas mitóticos siguiendo el protocolo detallado en MM1.1.2. Paralelamente, se colocó el resto de los tejidos de la larva en buffer de extracción de ADN para, una vez identificado el cariotipo, realizar la extracción de ADN.

Extracción de ADN

Para la obtención del ADN genómico total de machos y hembras de *A. fraterculus* sp. 1 para generar las sondas, se empleó el método descrito por Hoisington y González de León (1994), con modificaciones (sección MM1.3.2).

Cuantificación de ADN

La concentración y la calidad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa y por espectrofotometría utilizando un equipo Nanodrop 1000©, de la manera descrita en MM1.3.2.

Marcación de las sondas para GISH y CGH

La marcación de las sondas, se realizó en forma directa (Fantini, 2015), con una concentración final (C_f) [20 ng/ μ l] $_f$ de ADN total para 50 μ l de reacción, de la misma manera en que se describe en MM1.3.2.

Confirmación de marcación de las sondas

Para confirmar que las sondas para CGH se encontraban correctamente marcadas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % y también se realizaron reacciones de GISH.

- Los geles de agarosa tienen una concentración de 1 % p/v en Buffer TBE 0,5 % v/v. Se les adiciona Gel Red en una concentración de 1 μ g/ml de gel. El ADN se visualiza en un transiluminador UV, donde el ADN marcado se corre en forma paralela con muestras de ADN sin marcar que, por ser más liviano, se desplaza más rápido que el marcado en el gel.

MM3.1.3 GISH

- Las preparaciones de cromosomas mitóticos se realizan siguiendo el protocolo tradicional, citado en la sección MM1.1.2. Brevemente,

- Se envejecen 2 ó 3 días a 25°C antes de proceder a la hibridación.
- Para cada preparación se utiliza 1 µl sonda + 5 µl mix que se calienta a 70°C durante 7 min para desnaturalizar la sonda.
- Los preparados se desnaturalizan en una solución de formamida 70 % (en ETOH 100 %) a 70°C, durante 2 min.
- Luego de la desnaturalización del preparado, se realiza la deshidratación en una serie de alcoholes (70 % enjuague, 70 %, 90 %, 100 %), 2 min cada uno y se deja secar al aire.
- Una vez secado el preparado, se realiza la hibridación, se vierte sobre la región del preparado donde se encuentra el tejido fijado, la sonda y se deja en estufa ON a 40-45°C, en cámara húmeda.
- Al día siguiente, se los revela mediante un revelado rápido: 0,4xSSC/0,3 % Tween, 70°C, 2 min y 2xSSC/0,1 % Tween, TA, 2 min.
- Después del revelado, se tiñen con DAPI y se montan con *antifade* (ThermoFisher Scientific) para su observación con microscopio de epifluorescencia Olympus BX40F.

MM3.1.4 CGH

Se aplicó el protocolo descrito por Sahara et al. (2003), con algunas modificaciones.

Brevemente,

- Las preparaciones de cromosomas mitóticos, se realizan siguiendo el protocolo tradicional, citado en la sección MM1.1.2.
- Se envejecen 2 ó 3 días a 25°C antes de proceder a la hibridación.
- La mezcla de sondas a utilizar, se prepara con 2 µl sonda 1 + 2 µl sonda 2 + 5 µl mix. Esta mezcla se desnaturaliza primero a 70°C, durante 7 min y luego se la deja en estufa a 37°C, durante 90 min para co-hibridar en forma lenta. La mezcla de hibridación contiene 30 % de formamida, 30 % de polietilenglicol, 10 % de 2xSSC, 28 % de NaI y 2 % de Tween.

Tabla 10: Cócteles de sonda utilizados para analizar los diferentes cariomorfos de *A. fraterculus* sp. 1

Coctel de sondas Cariomorfos	(1) X ₁ X ₁ rojo/X ₁ Y ₅ verde	(2) X ₁ X ₁ verde/X ₁ X ₂ rojo
X ₁ X ₁	√	—
X ₁ Y ₅	√	√
X ₁ X ₂	√	—

- Los preparados se tratan con RNAsa, a 37°C durante 60 min. Se utiliza 1 µl RNAsa (1 mg/ml) + 4 µl 2xSSC por campo.
- Se enjuagan luego los vidrios en una solución de 2xSSC y se desnaturalizan en una solución de formamida 70 % a 68°C, durante 3,5 min.
- Luego de la desnaturalización del preparado, se realiza la deshidratación en una serie de alcoholes (70 % enjuague, 70 %, 90 %, 100 %), 2 min cada uno y se deja secar al aire.
- Una vez secado el preparado, se realiza la hibridación, se vierte sobre la región del preparado donde se encuentra el tejido fijado la mezcla de sondas y se deja en estufa ON a 45°C, en cámara húmeda.
- Al día siguiente, se los revela mediante un revelado rápido: 0,4xSSC/0,3 % Tween, 70°C, 2 min y 2xSSC/0,1 % Tween, TA, 2 min.
- Después del revelado, se tiñen con DAPI y se montan con *antifade* (ThermoFisher Scientific) para su observación con microscopio de epifluorescencia.

R3: COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

R3.1 GISH en *Anastrepha fraterculus* sp. 1

Se aplicó la técnica de GISH sobre metafases mitóticas de ganglio cerebral de larvas de 3er. estadio de *A. fraterculus* sp. 1 con dos finalidades: 1) para confirmar la marcación de las sondas genómicas obtenidas de hembras y de machos adultos y, 2) como control de especificidad de las mismas sondas, demostrando que el complemento cromosómico completo de cada sexo mostraba hibridación positiva. Se muestra en la Figura 41, una metafase de un macho de *A. fraterculus* sp. 1, en una reacción de GISH, donde su genoma (utilizado como sonda), se marcó con rodamina (rojo). Al igual que lo ocurrido cuando el individuo analizado fue hembra y se utilizó su genoma marcado como sonda, todo el complemento cromosómico se tiñó del color del fluorocromo utilizado para realizar la marcación.

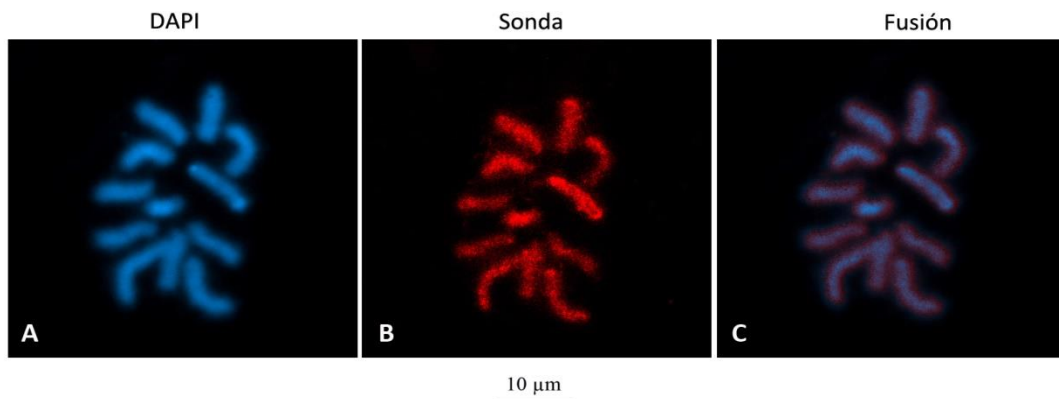


Figura 41: GISH de un macho de *A. fraterculus* sp. 1. A) Tinción con DAPI, B) sonda (genoma completo, marcado con rodamina), C) Fusión de las imágenes tomadas con los filtros para azul y rojo.

R3.2 CGH en *Anastrepha fraterculus* sp. 1

En la Figura 42, se muestran los resultados de los experimentos de CGH de hembras con cariotipo X_1X_1 y machos X_1Y_5 utilizando el cóctel 1 de sondas (X_1X_1 rojo/ X_1Y_5 verde, Tabla 10). Los cromosomas X_1 de las hembras (Figura 42, A-D), muestran una hibridación completa en rojo, dejando las regiones teloméricas sin teñir, al igual que lo que se observa en el cromosoma X_1 de las metafases de macho X_1Y_5 . Por otro lado, el cromosoma Y_5 de las metafases masculinas analizadas con el mismo cóctel de sondas (Figura 42, E-H), mostró una señal roja en la región centromérica del cromosoma, correspondiente a una hibridación positiva con la sonda del genoma de hembra (Figura 42, F y H), y una señal fluorescente verde hacia las regiones teloméricas de dicho cromosoma, exhibiendo una hibridación positiva con la sonda del genoma de macho (Figura 42, G y H).

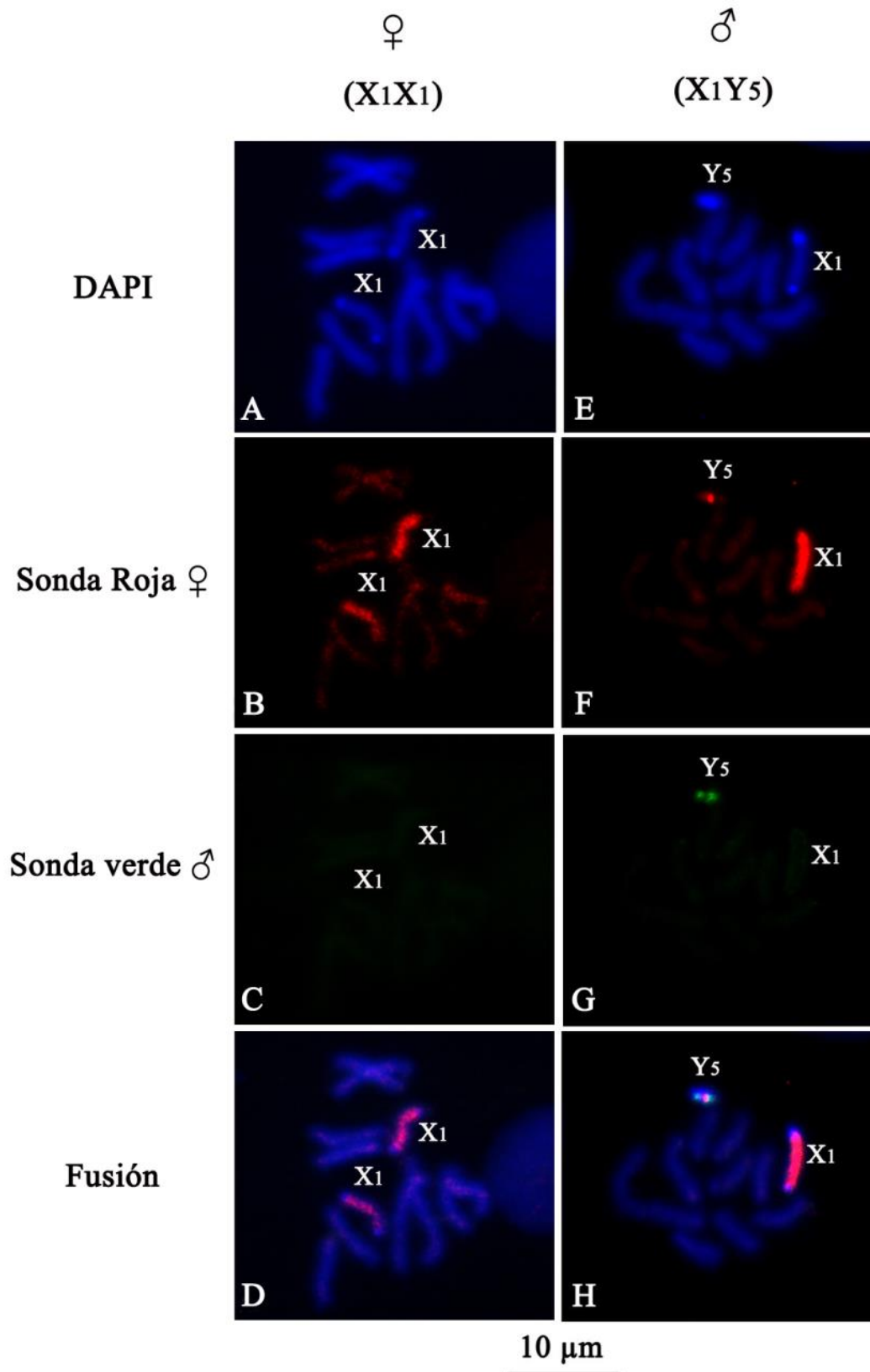


Figura 42: CGH en *A. fraterculus* sp. 1. A- D= Metafases de Hembra X₁X₁ (DAPI, sonda roja, sonda verde, fusión de las imágenes tomadas con todos los filtros), respectivamente). E-H= metafases de macho X₁Y₅ (DAPI, sonda roja, sonda verde, fusión de las imágenes tomadas con todos los filtros, respectivamente).

Para analizar la composición molecular de la variante X_2 , se estudiaron preparaciones de hembras con cariotipo X_1X_2 , con el mismo cóctel de sondas utilizado anteriormente (cóctel 1, Tabla 10). Los resultados pueden observarse en la Figura 43 (A-D), donde ambas variantes de cromosoma X (X_1 y X_2), presentaron el mismo patrón de hibridación observado para el cromosoma X_1 de las hembras con cariotipo X_1X_1 . Se corroboró la hibridación casi completa con la sonda femenina que excluye nuevamente a los telómeros e incluye esta vez, al satélite distal de la variante X_2 (Figura 43, B y D).

Al mismo tiempo se analizaron metafases de machos X_1Y_5 , utilizando el segundo cóctel de sondas (X_1X_1 verde/ X_1X_2 rojo, Tabla 10, Figura 44). En este caso, se observó un cromosoma X_1 con una señal roja intensa (Figura 44 B) e hibridado débilmente, a su vez, con la sonda verde (Figura 44 C), debido probablemente a una deficiencia de incorporación del fluorocromo verde. El cromosoma Y_5 , por su lado, no evidenció hibridación positiva con el cóctel de sondas usado (Figura 44 C y D). Con este experimento, se corrobora el patrón de hibridación descrito para el X_1 que no incluye los extremos del cromosoma (Figura 44 B-D) e indirectamente, demuestra la falta de homología entre el cromosoma X_2 y el Y_5 ya que, por las características de la técnica de CGH, quedaban disponibles para la hibridación, un cromosoma X marcado en verde (X_1) y un cromosoma X marcado en rojo (X_2).

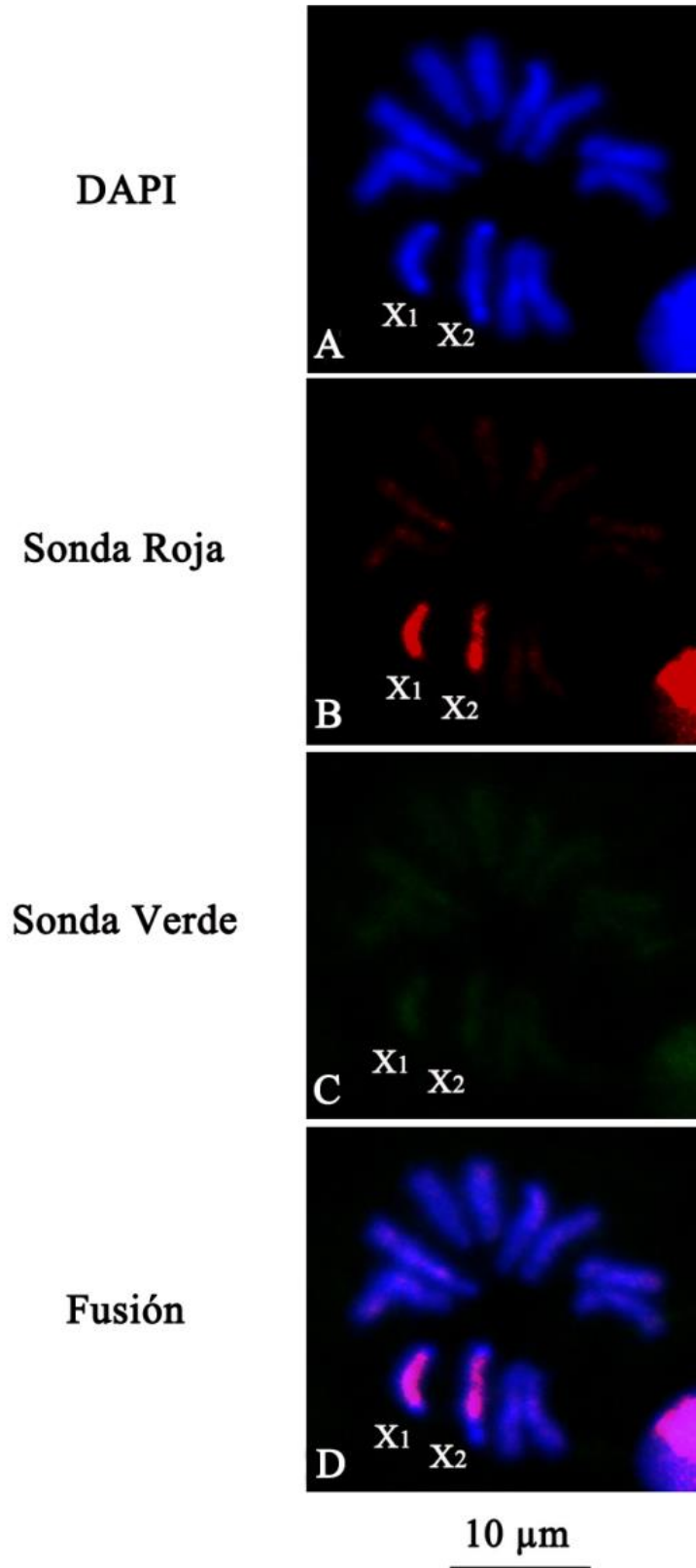


Figura 43: CGH de una hembra con cariotipo X_1X_2 , con sonda X_1X_1 marcada en rojo y sonda X_1Y_5 marcada en verde. A) Tinción con DAPI, B) sonda roja (cariotipo X_1X_1 , marcado con rodamina), C) sonda verde (cariotipo X_1Y_5 , marcado con fluoresceína) y D) Fusión de las imágenes tomadas con los filtros rojo y verde.

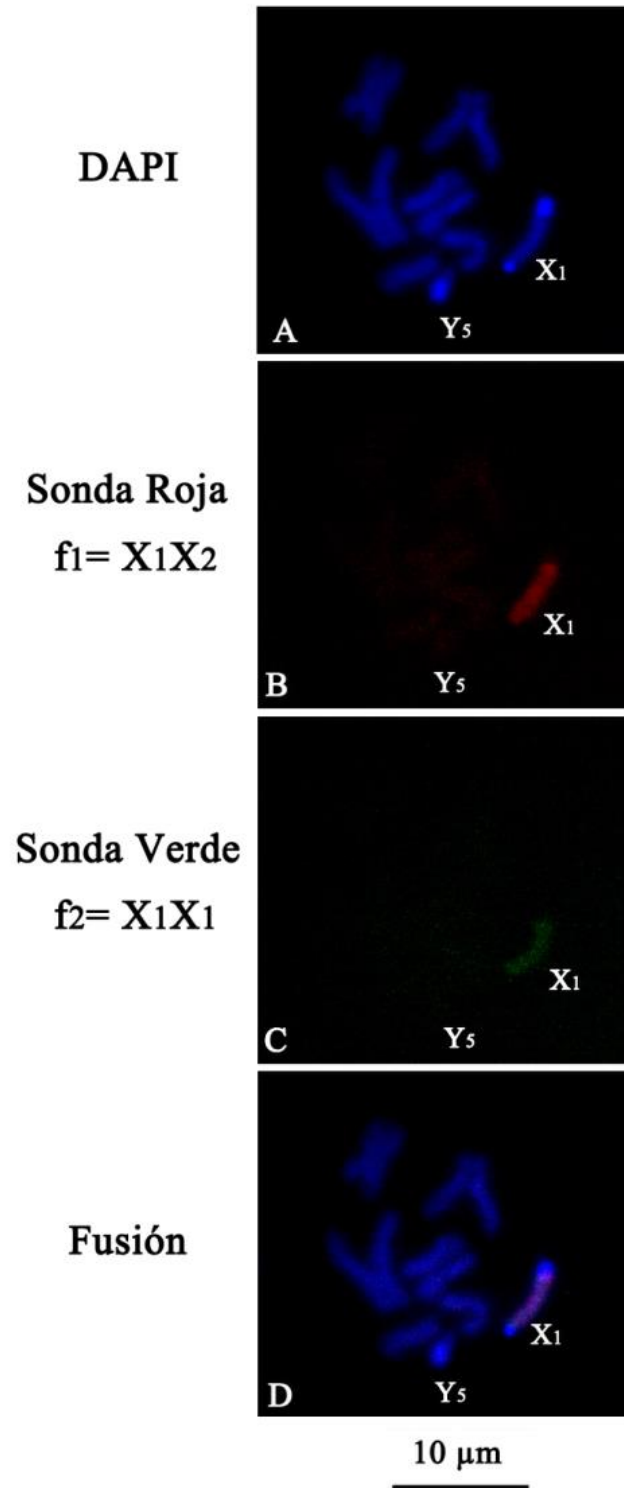


Figura 44: CGH de un macho con cariotipo X₁Y₅, con sonda X₁X₂ marcada en rojo y sonda X₁X₁ marcada en verde. A y E) Tinción con DAPI, B y F) sonda roja (cariotipo X₁X₂, marcado con rodamina), C y G) sonda verde (cariotipo X₁X₁, marcado con fluoresceína) y D y H) Fusión de las imágenes tomadas con los filtros rojo y verde.

D3: DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este último capítulo de la Tesis, complementan la caracterización de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, abordada en los capítulos anteriores y permite avanzar en el conocimiento molecular de estos cromosomas. Mediante la técnica de CGH se lograron localizar regiones de similar composición nucleotídica y, asimismo, evidenciar diferenciación molecular entre los cromosomas sexuales del morfotipo de *A. fraterculus* presente en nuestro país.

GISH y CGH en A. fraterculus sp. 1

La utilización de sondas de ADN genómico provenientes de individuos machos y hembras, ha permitido explorar la composición molecular de los cromosomas sexuales en los organismos que poseen un sistema de determinación cromosómica del sexo. En *A. fraterculus* sp. 1, los estudios de CGH llevados a cabo permitieron confirmar nuestra hipótesis de trabajo al identificar diferencias en la composición molecular entre los cromosomas X e Y. Particularmente, la variante cromosómica X₂ posee el mismo patrón de hibridación que el cromosoma X₁ (Figura 43), evidenciando la homología existente entre ambas variantes (X₁ y X₂) y, denotando en forma indirecta, la ausencia de homología con el cromosoma Y₅ (Figura 44). Asimismo, la diferencia de morfología observada entre las variantes de cromosomas X, se debe a un satélite localizado en la región distal de la variante X₂, el cual produce la diferencia de tamaño entre dichos cromosomas X. Además, el complemento autosómico mostró una fluorescencia equilibrada en todos los experimentos realizados, como era de esperarse debido a la naturaleza de estos cromosomas y como fue observado en otras especies (Traut, 1999; Traut et al., 2001).

Los resultados obtenidos en este capítulo, ponen a disposición nuevos conocimientos que reforzarían la idea de un origen común de las variantes de cromosomas X descritas (X₁ y X₂), con una posterior diferenciación del cromosoma Y₅, y otorgan evidencias plausibles sobre el proceso evolutivo que atraviesa actualmente *A. fraterculus* sp. 1. Futuros experimentos de CGH de individuos que porten a la variante Y₆ en sus cariotipos, permitirían profundizar los conocimientos sobre la composición molecular de dicho cromosoma que no pudo ser estudiada aún. Asimismo, otras técnicas modernas de citogenética, como el pintado completo de cromosomas (Pita et al., 2017; Hou et al., 2018; Hua y Mikawa, 2018; Albert et al., 2019; Gokhman et al., 2019), en conjunto con estudios de secuencias de genoma completo (Papanicolaou et al., 2016; Bayega et al., 2020), permitirán profundizar el estudio molecular de las variantes de cromosomas sexuales registradas en *A. fraterculus* sp. 1 de Argentina.

Anastrepha fraterculus sp. 1 y el sistema de determinación sexual XY

Como se describió a lo largo de todo este trabajo de Tesis, los distintos caminos evolutivos generalmente apuntan hacia cromosomas sexuales altamente diferenciados: un cromosoma Y degenerado y pobre en genes y un cromosoma X, con dosis compensada (Charlesworth y Charlesworth, 2000; Bachtrog, 2006, 2013; Vicoso y Bachtrog, 2015). En este sentido, el sistema de determinación sexual identificado en *A. fraterculus* sp. 1, se encontraría en activa diferenciación molecular. Antes de discutir particularmente los resultados de CGH, realizados en los cromosomas mitóticos de nuestra especie de estudio, debería tenerse en cuenta que la eficacia de dicha técnica podría verse limitada al tratar de identificar cromosomas sexuales demasiado jóvenes, con secuencias específicas de sexo muy pequeñas, como se demostró por ejemplo, en la iguana *Oplurus fierinensis* (Altmanová et al., 2016; Yano et al., 2017). Específicamente, los resultados obtenidos en *A. fraterculus* sp. 1, evidenciaron que el cromosoma X₁ porta secuencias femeninas en toda su extensión, sin incluir los extremos teloméricos (Figura 42, A-D) e indicando una completa diferenciación molecular de este cromosoma, en comparación con el cromosoma Y. Por el contrario, el cromosoma Y₅ aún conserva secuencias de ADN femenino en su región centromérica, mientras que en el resto del cromosoma sólo se encontraron secuencias derivadas del cromosoma Y (Figura 42, E-H).

A partir del conocimiento de que los cromosomas sexuales derivan de autosomas, y que por la adquisición del factor determinante del sexo (factor M en sistemas XY) se suprime la recombinación entre ellos, este evento propicia el inicio del proceso de diferenciación entre los cromosomas sexuales hasta tener una composición molecular distinta que indica su “momento” en el camino evolutivo. El resultado obtenido en *A. fraterculus* sp. 1 tiene entonces dos importantes implicancias en relación al estudio de su determinación sexual, primero, el centrómero no es la zona de alojamiento del factor determinante de la masculinidad aunque sí, lo sería la región que lo rodea (región pericentromérica). Este último resultado, está basado en lo anteriormente descrito en *Ceratitis capitata* (Lifschitz y Cladera, 1989; Willhoeft y Franz, 1996; Meccariello et al., 2019). Segundo, el sistema sexual es joven en términos evolutivos, en relación al grado de diferenciación observado entre los cromosomas sexuales de la especie, luego de los estudios de CGH realizados. En este sentido, antecedentes en el estudio del cromosoma Y del pez lobo *Hoplias malabaricus*, observaron una acumulación de secuencias de ADN masculino en la región pericentromérica de dicho cromosoma e infirieron que dicho patrón reflejaba una etapa incipiente de diferenciación dentro de la región específica masculina de los cariomorfos estudiados (de Freitas et al., 2018; de Oliveira et al., 2019; Sember et al., 2018).

DG: DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios de citogenética y genómica han resultado ser importantes herramientas para el estudio de la biodiversidad y la taxonomía en numerosos organismos, particularmente ayudando en la identificación de especies crípticas (Singh, 2016; de Moraes et al., 2017; Fuller et al., 2019). Sin embargo, dentro de los insectos, las especies de moscas que pertenecen al complejo *Anastrepha fraterculus sensu stricto*, siguen escasamente exploradas en estos campos, siendo parcial la información disponible sobre los morfotipos integrantes del mismo (Basso et al. 2003; Lifschitz et al., 1999; Basso, 2003; Selivon et al., 2005a, 2005b, 2022; Giardini, 2006; Goday et al., 2006; Giardini et al., 2015). En este sentido, el desafío principal para este trabajo de Tesis Doctoral, fue profundizar el estudio de los cromosomas de uno de los miembros del complejo *A. fraterculus*, denominado *A. fraterculus* sp. 1. El objetivo a largo plazo de este estudio, y quizás de todos los trabajos que involucran especies plaga, es aportar información original y aplicable a su control. En general, para poder desarrollar e implementar técnicas de control de plagas específicas y amigables con el medio ambiente, como la TIE, es fundamental dilucidar si nos encontramos frente a una o más entidades biológicas a combatir. La implementación de la TIE considera como un aspecto clave de la biología de la especie blanco, la compatibilidad reproductiva entre organismos, dado que se basa en el apareamiento de los insectos estériles liberados con los silvestres (Knipling, 1955; Munhenga et al., 2011; Cladera et al., 2014). En este contexto, los antecedentes disponibles sobre el complejo de especies crípticas *A. fraterculus* y sus morfotipos, los estudios previos realizados específicamente sobre el morfotipo 1 y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, evidencian la presencia de un único miembro de dicho complejo en nuestro país, mostrando matices de complejidad genética dentro de este grupo taxonómico. Asimismo la información obtenida y analizada aquí sobre *A. fraterculus* sp. 1, podría ser aplicada al estudio ampliado de los otros morfotipos complementando los antecedentes previos en estudios citogenéticos (Selivon et al., 2005a, 2005b, 2022; Giardini, 2006; Goday et al., 2006; Castañeda et al., 2015; Giardini et al., 2015; Canal et al., 2018).

Caracterización de los cromosomas mitóticos y politénicos de A. fraterculus sp. 1

La identificación de polimorfismos en los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, nos llevó a profundizar la caracterización de las variantes identificadas. Los resultados mostraron una diferencia en la composición de bases de los bloques de heterocromatina del cromosoma X (X_1 y X_2), con respecto al cromosoma Y (Y_5). Estas diferencias habían sido reportadas previamente en *A. fraterculus* sp. 3 y se propuso que dicha variabilidad se corresponde con

una historia evolutiva más reciente, en comparación con las otras especies de *Anastrepha* (Norrbon et al., 1999; Goday et al., 2006).

En relación al estudio citogenético- molecular del cariotipo mitótico, los experimentos de FISH con una sonda específica del gen 18S del arreglo de genes ribosomales, diseñada para nuestro morfotipo, nos permitieron localizar inequívocamente esta región genómica, en los extremos distales de ambas variantes de cromosoma X y en los dos bloques de heterocromatina del cromosoma Y₅. Dichos resultados confirman lo observado en nuestro laboratorio anteriormente (Giardini et al., 2015) y, concuerdan con los hallados por Goday y colaboradores, utilizando una sonda heteróloga de *Drosophila melanogaster* (Goday et al., 2006).

Por otro lado, el mapa detallado de cromosomas politénicos obtenido como producto de esta Tesis, permitió reafirmar la presencia de cinco elementos politenizados que corresponden a los autosomas de *A. fraterculus* sp. 1. Asimismo, se confirmaron ciertas características del complemento politénico que habían sido previamente observadas en otros tefritidos, como la disposición de los cromosomas sin formación de cromocentro y el apareamiento ectópico de sus telómeros (Mavragani-Tsipidou et al., 1992; Zhao et al., 1998; García-Martínez et al., 2009; Giardini et al., 2009; Zacharopoulou et al., 2011, entre otros). El patrón de bandas característico, constante y distintivo de estos cromosomas, permitiría realizar una correlación entre la estructura cromosómica y génica de *A. fraterculus* sp. 1 y comparar esta información con los demás miembros del complejo de especies crípticas identificados hasta el momento (Gariou-Papalexíou et al., 1999; Zhimulev et al., 2004; Sumner, 2008). Si bien ya se había observado que los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 no forman elementos politenizados (Giardini et al., 2009), los ensayos de FISH realizados con la sonda de ADN_r 18S fueron concluyentes en confirmar de una manera directa la no-politenización de estos cromosomas, al obtener una señal positiva en una región de heterocromatina no condensada. En concordancia con estos resultados Drosopoulou y colaboradores describieron la no-politenización de los cromosomas sexuales de *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), a partir de la generación de sondas de FISH específicas de cada cromosoma sexual, obtenidas por microdissección cromosómica (Drosopoulou et al., 2012).

Distribución geográfica de los cariomorfos de A. fraterculus sp. 1. Posibles rutas de introducción de la plaga a nuestro país

La identificación y caracterización de los polimorfismos de cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, logrados como producto de esta Tesis, llevaron a la realización de análisis poblacionales para conocer sus frecuencias en las poblaciones silvestres de Argentina. En este

sentido, las variantes de cromosomas sexuales halladas en las poblaciones silvestres (X_1 , X_2 , Y_5 e Y_6) coinciden con las que se habían descrito en las poblaciones de laboratorio que a su vez, difieren con las reportadas previamente (Lifschitz et al., 1999; Manso and Basso, 1999; Basso et al., 2003; Basso, 2017; Basso et al., 2019). Luego del exhaustivo trabajo de muestreo informado en esta Tesis se concluye que sólo dos tipos de cromosomas X (X_1 y X_2) y dos de cromosomas Y (Y_5 e Y_6) coexisten en la actualidad y se mantienen con frecuencias cromosómicas en equilibrio. Posiblemente las formas cromosómicas reportadas previamente (Lifschitz et al., 1999; Manso y Basso, 1999; Basso et al., 2003) se encontraban en muy baja frecuencia, o en poblaciones aisladas y, por ese motivo, no han sido encontradas en los muestreos realizados en la actualidad, en concordancia con fenómenos similares de pérdida de variabilidad genética o cuellos de botella asociados a la colonización y dispersión de la plaga descritos previamente (Hedrick, 1981; Berry et al., 1991).

Los resultados mostrados en esta Tesis confirman que el morfotipo presente en Argentina, corresponde a *A. fraterculus* sp. 1 y es el único miembro del complejo *A. fraterculus sensu stricto* identificado en nuestro país hasta el momento. Asimismo, se evidenció que los polimorfismos cromosómicos sexuales descritos, coexisten tanto en las poblaciones naturales como en las líneas establecidas en el laboratorio.

La caracterización citogenética realizada en las poblaciones establecidas en nuestro laboratorio, permitió detectar en las líneas de laboratorio Af-Cast-1 y Af-Cast-2 (portadoras de diferentes cepas de *Wolbachia* sp.), dos cariomorfos que no se habían observado antes (hembras X_2X_2 y machos X_2Y_5). Este hallazgo se considera como potencial disparador de estudios más profundos sobre la incidencia de *Wolbachia* con respecto a la frecuencia de los cariomorfos de *A. fraterculus* descritos en nuestro país (Lassy y Karr, 1996; Tram y Sullivan, 2002; Landmann et al., 2009; Beckmann et al., 2017).

Examinando conjuntamente, los análisis citológicos realizados en las poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1 y los conocimientos previos de la distribución geográfica de los morfotipos de *A. fraterculus* en Sudamérica, es posible generar una hipótesis sobre el ingreso del morfotipo 1 (particularmente de los cariomorfos más frecuentes X_1X_1/X_1Y_5) a nuestro país. Considerando los patrones de dispersión de la mosca, el ingreso podría haber ocurrido por Misiones proveniente de Brasil, dada la presencia de este morfotipo en el límite geográfico entre ambos países (Selivon et al., 2005; Goday et al., 2006; Giardini et al., 2015). Asimismo, en cuanto al posible origen no-monofilético de *A. fraterculus* en América del Sur planteado recientemente (Hendrichs et al., 2015; Mengual et al., 2017), los estudios poblacionales efectuados, no son concluyentes. Futuros estudios de hibridación entre morfotipos dentro del complejo *A. fraterculus*, en combinación con estudios citogenéticos y de parámetros biológicos

de las entidades puras y sus híbridos, y su descendencia permitirán realizar nuevas interpretaciones respecto de las distintas hipótesis sobre el origen y diversificación de la especie (Cáceres et al., 2009; Gilchrist et al., 2014; Vilardi et al., 2021; Selivon et al., 2022).

Origen de las variantes de cromosomas sexuales en *A. fraterculus* sp. 1: Reordenamientos cromosómicos y Heterocromatinización

La descripción de los cariomorfos presentes en las poblaciones silvestres y de laboratorio de *A. fraterculus* sp. 1 y el estudio estadístico de sus frecuencias poblacionales, nos permiten realizar inferencias sobre la generación de las variantes cromosómicas minoritarias a partir de las más frecuentes. Como resultado de nuestras observaciones planteamos la hipótesis de que el cromosoma X_2 podría haberse originado a partir del X_1 , mediante una duplicación del bloque heterocromático proximal, seguida de una ruptura cromosómica y una posterior unión a la región telomérica distal, dando lugar al satélite heterocromático X_2 (Figura 45 B, izquierda).

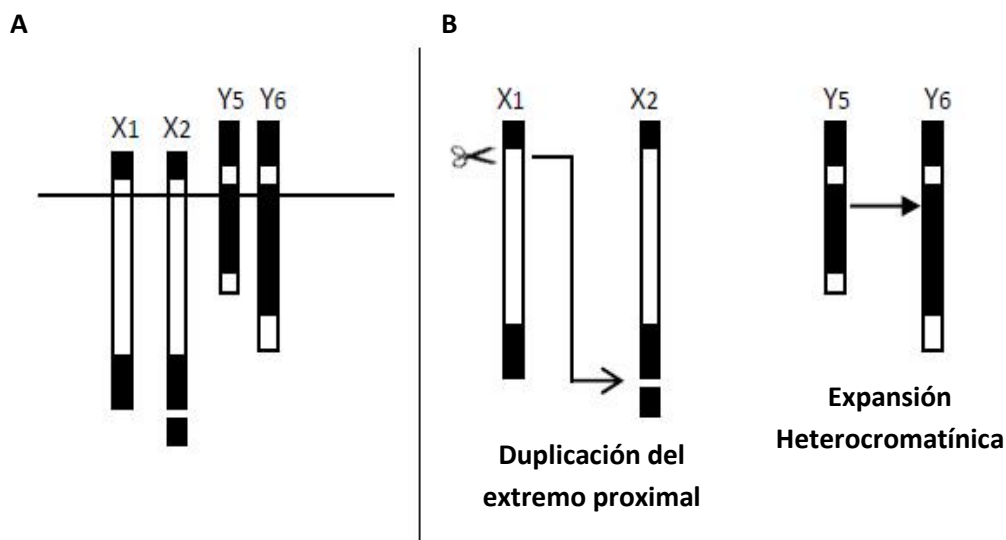


Figura 45: Esquema de formación de las variantes cromosómicas minoritarias, a partir de reordenamientos cromosómicos de las más frecuentes. En A, se esquematizan las variantes cromosómicas existentes en *A. fraterculus* sp. 1 y en B, se esquematiza la hipótesis planteada.

Esta hipótesis es apoyada por estudios previos sobre el comportamiento de los cromosomas durante la división celular, en la cual, los centrómeros adoptan una estructura compleja que los expone como sitios lábiles para reordenamientos cromosómicos (Santaguida y Musacchio, 2009; Tanaka et al., 2013; Barra y Fachinetti, 2018). Para nuestro estudio, estos antecedentes apoyarían la hipótesis de que el sitio cromosómico más probable de sufrir duplicación y/o rotura en el cromosoma X_1 para formar el satélite del X_2 , es la zona proximal y pericentromérica. Además, las regiones cromosómicas donde se encuentran secuencias repetitivas, parecen ser zonas “sustrato” para que ocurran reordenamientos cromosómicos,

como las inversiones (Bailey et al., 2004; Cordaux y Batzer, 2009; Potter et al., 2017). Por otro lado, en cuanto al surgimiento de la variante Y_6 , se propone que dicho cromosoma podría derivar del Y_5 por duplicación y expansión del bloque heterocromático más grande (Figura 45 B, derecha). Este fenómeno de expansión heterocromática, ha sido reportada previamente en poblaciones naturales de peces, denominados comúnmente como, cuchillo de cristal (De Almeida Toledo y Foresti, 2001; Henning et al., 2011). Estos autores concluyen que la restricción de la recombinación suele ser más drástica en las regiones aledañas al locus de determinación del sexo del cromosoma Y y, por lo tanto, se espera que conduzca a una degeneración génica y a una mayor expansión del ADN repetitivo en dicho cromosoma (Charlesworth, 1991; Henning et al., 2011). Esto explicaría la expansión marcada del bloque de heterocromatina, que se observa fundamentalmente, en el brazo largo del cromosoma Y_5 dando lugar a la variante Y_6 de *A. fraterculus* sp. 1. Más aún, la generación de ambas variantes cromosómicas minoritarias (X_2 e Y_6) podría explicarse en el contexto de un proceso denominado heterocromatinización, componente de un mecanismo más complejo llamado regulación eurigénica (Zuckerkindl y Hennig, 1995). Como parte de la dinámica cromosómica y celular, es frecuente observar eventos de ruptura de un extremo o segmento cromosómico que dejan regiones lábiles, propensas a heterocromatinización. La heterocromatina se propagaría luego mediante "contagio por proximidad", estabilizando las estructuras de cromatina más abiertas (Dorer y Henikoff, 1994; Elder y Turner, 1995; Nieves, 2007). En gran diversidad de organismos, la heterocromatinización, acompañada por la amplificación de repeticiones en tándem, representa un paso importante en la diferenciación morfológica de sistemas de cromosomas sexuales simples, como el descrito en *A. fraterculus* sp. 1 (Nanda et al., 2000; Kondo et al., 2004; Marchal et al., 2004; Peichel et al., 2004; Charlesworth et al., 2005; Ezaz et al., 2009; Kejnovsky et al., 2009).

Localización del factor M: Evidencias a partir de antecedentes en otras especies

Teniendo en cuenta los antecedentes registrados en *C. capitata* con respecto a la identificación y localización de regiones genómicas asociadas a la masculinidad en la región pericentromérica del cromosoma Y (Lifschitz y Cladera, 1989; Willhoeft y Franz, 1996; Meccariello et al., 2019), en esta Tesis se realizaron los experimentos de AFLP y microdissección orientados a conocer la estructura molecular de ese cromosoma sexual en *A. fraterculus*. Si bien estos ensayos no arrojaron resultados positivos, permitieron evaluar nuevas posibilidades metodológicas basadas en abordajes moleculares. En este sentido, los conocimientos futuros sobre el genoma completo de *A. fraterculus* sp. 1, en conjunto con la utilización de técnicas de citogenética

molecular, permitirán reformular y concretar el objetivo de hallar secuencias de ADN asociadas a la determinación del sexo localizadas en el cromosoma Y, en nuestra especie de estudio.

Siguiendo la misma línea de razonamiento, y con el objetivo de continuar explorando la composición molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, se puso a punto la técnica de CGH. Los experimentos de hibridación comparativa de genomas fueron concluyentes en evidenciar el alto grado de diferenciación molecular existente entre los cromosomas sexuales de la especie. El cromosoma X (particularmente sus variantes X₁ y X₂), se encuentra completamente diferenciado del cromosoma Y, mostrando sólo ADN femenino en toda su extensión. Contrariamente, el cromosoma Y₅ conserva secuencias de ADN de hembra en la región centromérica, mientras que el resto del cromosoma presenta sólo secuencias derivadas de macho. Al igual que en los organismos donde se utilizó la técnica de CGH previamente (Traut et al., 1999; Montiel et al., 2017; de Freitas et al., 2018; Sember et al., 2018; Zrzavá et al., 2018; De Moraes et al., 2019; de Moraes et al., 2021), para nuestro estudio, representó una herramienta lo suficientemente sensible como para revelar diferencias y similitudes entre los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1.

En congruencia con los resultados de citogenética clásica obtenidos en esta Tesis, el análisis de CGH nos permite contribuir a la hipótesis sobre la evolución de los cromosomas sexuales a través del proceso de heterocromatinización. Este complejo proceso estaría acompañando la evolución de las variantes de cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1. Dicho fenómeno, sumado a la composición diferencial reflejada en la heterocromatina de las variantes de los cromosomas sexuales, podría explicar los distintos patrones de hibridación que se manifestaron en las regiones del ADNr. Al respecto, existe evidencia citogenética-molecular de reordenamientos cromosómicos que involucran loci de ADNr, donde se destaca su probable papel en la evolución de los cromosomas sexuales, al facilitar la reducción de la recombinación entre ellos (Yano et al., 2017). En este aspecto, queda aún más claro que nuestra especie se encuentra en un proceso activo de evolución, donde los cromosomas sexuales están sujetos a fuerzas evolutivas que podrían ser parte de una selección sexual interviniente (Graves, 2006; Bachtrog et al., 2011; Yano et al., 2017).

Los resultados de CGH, también respaldan la hipótesis citada en la Figura 45, aunque se deben realizar más estudios citológicos para concluir la caracterización de los extremos de ambos cromosomas X. Por otro lado, la variante minoritaria Y₆, que fue caracterizada solamente con la tinción DAPI, deberá ser estudiada más exhaustivamente mediante citogenética clásica y molecular, ya que podría arrojar información valiosa en el análisis evolutivo de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1.

Los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1: Resumen de su caracterización citogenética

Una manera integral de visualizar y relacionar todos los resultados expresados en este trabajo de Tesis, es reunir en una sola figura la información de la caracterización citogenético-molecular de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1 y sus variantes (Figura 46). La tinción de bandas C, permitió caracterizar el cariotipo de *A. fraterculus* sp. 1 en cuanto al número de cromosomas totales que porta la especie y permitió también la identificación de los bloques de heterocromatina presentes en los cromosomas sexuales X_1 , Y_5 y X_2 (Figura 46 A). Al igual que en las demás especies de *Anastrepha* donde se realizaron estudios de citogenética clásica, los autosomas no parecen ser reactivos a los métodos empleados para identificar los bloques de heterocromatina (Bandas C), como tampoco reaccionaron al método de bandas secuenciales DAPI/CMA₃, aplicado para estudiar la composición de bases de dichos bloques (A-T/G-C) (Selivon y Perondini, 1997; Selivon et al., 2005a, 2022; Goday et al., 2006) (Figura 9 y 10-Capítulo 1). En cuanto a la composición de bases de la heterocromatina de los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, se concluyó que las variantes de cromosoma X estudiadas, poseen bloques heterocromáticos ricos en pares A-T (DAPI+) en ambos extremos (Figura 46 A). Sin embargo, la heterocromatina presente en el cromosoma Y_5 , al teñirse con DAPI y con cromomicina (CMA₃), nos indica que es rica tanto en secuencias A-T, como en G-C (CMA₃+) (Figura 46 B). Este resultado, evidencia la importancia de la aplicación simultánea de ambas técnicas para estudiar en detalle la heterocromatina de una y además contribuye con información para generar posibles interpretaciones sobre el origen de dicha cromatina; ya que, previamente en insectos himenópteros, por ejemplo, se propuso que una composición diferencial de bases implicaba orígenes independientes de la heterocromatina (Costa et al., 2004; Domingues et al., 2005).

La distribución de los *clusters* de genes ribosomales evidencia un patrón diferencial cuando comparamos las variantes de cromosomas X de *A. fraterculus* sp. 1 (X_1 y X_2) y el cromosoma Y_5 (Figura 46 C). Como se ha detallado previamente (Figura 21-Capítulo 1), el ADNr se encuentra localizado específicamente en los extremos distales del cromosoma X_1 y del cromosoma X_2 , mientras que en el cromosoma Y_5 co-localiza con los bloques de heterocromatina. Este resultado remarca la complejidad existente en la heterocromatina del cromosoma Y_5 , dado que, además de ser rica en bases A-T y bases G-C, también aloja genes ribosomales. A su vez, se observó mediante la hibridación comparativa de genomas que los cromosomas X_1 y X_2 no mostraron señales de homología en sus extremos, en los cuales ninguno de los cócteles utilizados como sonda, hibridaron positivamente (Figura 46 D). Evidentemente, las regiones terminales de los cromosomas X de *A. fraterculus* sp. 1 donde se localiza el ADNr, estarían participando de procesos dinámicos y activos evolutivamente, impulsando a profundizar el

estudio de estas regiones. Numerosos ejemplos, indican que las regiones organizadoras nucleolares (NOR) donde se hallan localizados los *clusters* ribosomales, están directamente relacionadas con los procesos evolutivos y han sido estudiados en múltiples y variados organismos como los primates del viejo mundo (Gerbault-Seureau et al., 2018), roedores (Bardhan y Sharma, 2000; Britton-Davidian et al., 2011), peces de agua dulce (De Almeida Toledo y Foresti, 2001; Rábová et al., 2001; Yano et al., 2016), arácnidos (Reyes Lerma et al., 2021) e insectos (Bione et al., 2005), entre otros. Más aún, los resultados de FISH y CGH permiten apoyar el origen independiente de la heterocromatina presente en los cromosomas X₁, X₂ e Y₅, a partir del análisis de composición de bases de la misma, con las bandas DAPI/CMA₃ (Costa et al., 2004; Domingues et al., 2005).

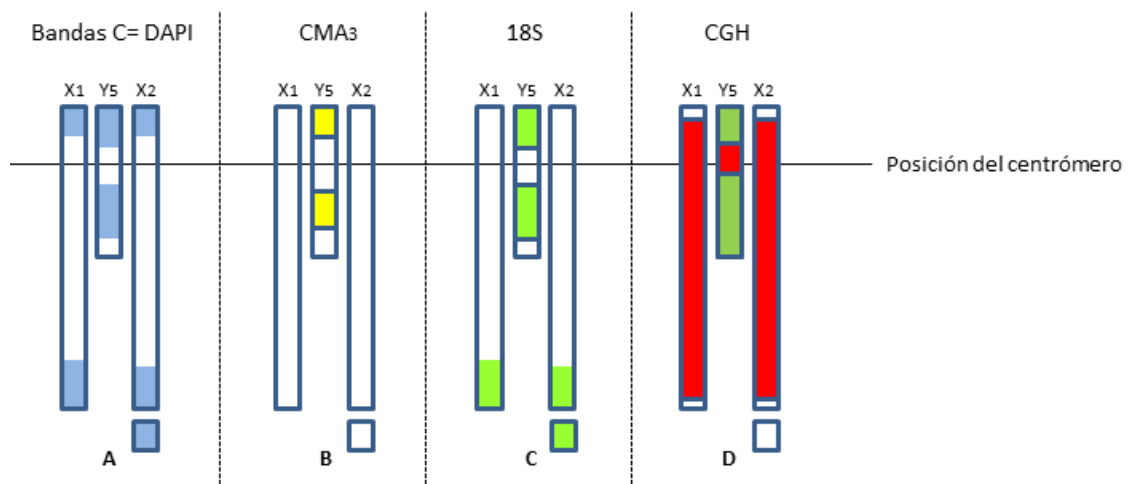


Figura 46: Ideograma de las variantes de cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, estudiadas con técnicas de citogenética clásica y molecular: Bandas C, Bandas DAPI/CMA₃, FISH con 18S ADN y CGH.

Identificar las causas y los efectos de los cambios en los cromosomas sexuales ha sido un objetivo importante y a largo plazo en la genética evolutiva (Stevens, 1905; White, 1940; Bull, 1983; van Doorn, 2014). Nuestro morfotipo constituye un nuevo ejemplo que muestra que los reordenamientos cromosómicos son potentes impulsores de evolución (Altmanová et al., 2016; Sangpakdee et al., 2016; De Moraes et al., 2017, 2019). La dinámica del ADN repetitivo, también parecería estar contribuyendo significativamente a la divergencia del cariotipo en *A. fraterculus*, así como se observó en los diversos organismos citados anteriormente, donde los reordenamientos cromosómicos que involucran este tipo de ADN, y en especial el ADN_r, son los principales motores de la evolución de sus cariotipos (Yano et al., 2016; De Moraes et al., 2019).

Si bien quedan numerosos interrogantes en torno a esta especie, las investigaciones citológicas como las presentadas en esta Tesis contribuyen con el conocimiento citogenético del

morfotipo *A. fraterculus* sp. 1 y el complejo de especies crípticas, al tiempo que resaltan la importancia de utilizar citogenética clásica y molecular de forma complementaria a los estudios taxonómicos, comportamentales, poblacionales, evolutiva y ecológica en insectos. A su vez, al tratarse de una especie de interés agronómico, los aportes de esta Tesis Doctoral contribuyen con información original para el desarrollo e implementación de medidas específicas de control de esta importante plaga de América del Sur.

CG: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS



El estudio del cariotipo mitótico de *A. fraterculus* sp. 1 (mediante bandas C, bandas DAPI/CMA₃ y FISH de ADNr 18S) y su complemento politénico, permitió caracterizar el morfotipo presente en las poblaciones argentinas, incrementando la información citogenética disponible de las entidades biológicas, miembros del complejo *Anastrepha fraterculus sensu stricto*.



Los análisis citológicos realizados en esta Tesis, evidenciaron la presencia de variaciones estructurales en los cromosomas sexuales de *A. fraterculus* sp. 1, no reportadas hasta el momento en otros miembros del complejo de especies crípticas *A. fraterculus*.



El estudio de distribución geográfica de los cariomorfos presentes en poblaciones silvestres de *A. fraterculus* sp. 1 permitió plantear posibles escenarios evolutivos que pudieran dar origen a las variantes polimórficas detectadas.



Se detectaron en baja frecuencia hembras X₂X₂ y machos X₂Y₅, en dos poblaciones de laboratorio, que no se habían observado previamente, evidenciando un cambio de frecuencias de los cariomorfos en dichas líneas que podrían ser manejados para originar cepas de moscas con características citogenéticas diferenciales.



Se pusieron a punto los marcadores moleculares AFLP para la detección de diferencias entre machos y hembras en *A. fraterculus* sp. 1. Estudios futuros usando esta técnica con otras combinaciones de enzimas y herramientas genómicas podrán brindar información de secuencia nucleotídica y sondas genómicas útiles para complementar análisis de hibridación sexo-específicos.



Los experimentos de CGH permitieron identificar regiones cromosómicas exclusivas de cada uno de los cromosomas sexuales analizados de *A. fraterculus* sp. 1. Se realizarán futuros experimentos de hibridación comparativa de genomas en conjunto con FISH de regiones específicas y pintado cromosómico total, para brindar mayor conocimiento sobre la estructura e identidad de los cromosomas sexuales en este morfotipo y contribuir también al estudio de entidades diferenciadas dentro del complejo *A. fraterculus*.

Anexo de Figuras y Tablas

Capítulo 1

Amplificación por PCR y secuenciación de una región del arreglo de genes ribosomales nucleares (700 pb de la subunidad 18S)

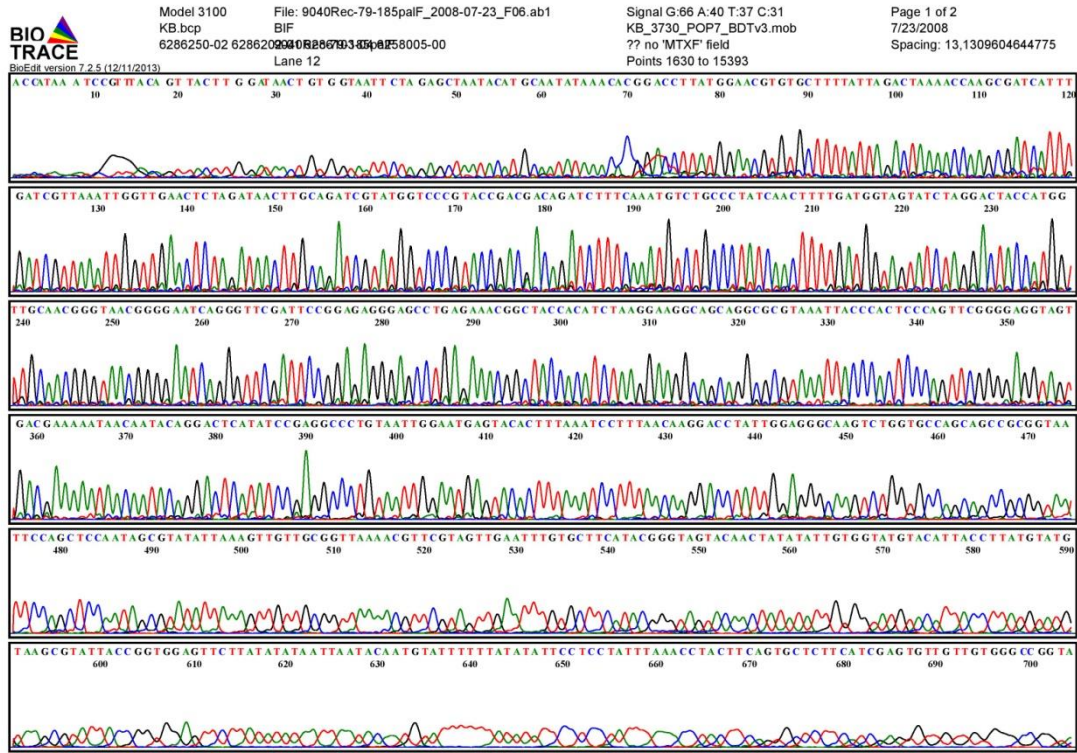


Figura 1: Cromatograma correspondiente a la secuencia nucleotídica del amplicón 18S (aproximadamente 700 bases) obtenido con el primer forward (18SgalF).

Anastrepha fraterculus 18S ribosomal RNA gene, complete sequence

Sequence ID: [AF187101.2](#) Length: 1980 Number of Matches: 1

Range 1: 117 to 1236 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1718 bits(930)	0.0	1069/1129(95%)	38/1129(3%)	Plus/Plus
Query 2	CCATAAATCCGTTTACAGTTACTTGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCAA			61
Sbjct 117	CCATAGAT -CGTT AACAGTTACTTGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCAA			175
Query 62	TATAAACACGGACCTTATGGAACGTGTGCTTTTATTAGACTAAAACCAAGCGATCATTTG			121
Sbjct 176	TATAAACACGGACCTTATGGAACGTGTGCTTTTATTAGACTAAAACCAAGCGATCATTTG			235
Query 122	ATCGTTAAATGGTTGAACTCTAGATAACTTGCAGATCGTATGGTCCCGTACCGACGACA			181
Sbjct 236	ATCGTTAAATGGTTGAACTCTAGATAACTTGCAGATCGTATGGTCCCGTACCGACGACA			295
Query 182	GATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTTTTGATGGTAGTATCTAGGACTACCATGGTTG			241
Sbjct 296	GATCTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACTTTTGATGGTAGTATCTAGGACTACCATGGTTG			355
Query 242	CAACGGGT AACGGGAATCAGGGTTCGATCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA			301
Sbjct 356	CAACGGGT AACGGGAATCAGGGTTCGATCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA			415
Query 302	CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCACTCCCAGTTCGGGGAGGTAGTGACG			361
Sbjct 416	CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCACTCCCAGTTCGGGGAGGTAGTGACG			475
Query 362	AAAAATACAATACAGGACTCATATCCGAGGCCCTGTAAATGGAATGAGTACACTTTAAA			421
Sbjct 476	AAAAATACAATACAGGACTCATATCCGAGGCCCTGTAAATGGAATGAGTACACTTTAAA			535
Query 422	TCCTTTAACAAAGGACCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGC			481
Sbjct 536	TCCTTTAACAAAGGACCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATCCAGC			595
Query 482	TCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCGGTTAAAACGTTTCGTAGTTGAATTTGTGCTTCA			541
Sbjct 596	TCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCGGTTAAAACGTTTCGTAGTTGAATTTGTGCTTCA			655
Query 542	TACGGGTAGTACAACATATATTGTGGTATGTACATTACCTTATGTATGTAAAGCGTATTA			601
Sbjct 656	TACGGGTAGTACAACATATATTGTGGTATGTACATTACCTTATGTATGTAAAGCGTATTA			715
Query 602	CCGGTGGAGTTCCTATATATAATTAATACAATGTATTTTTATATATTCTCCTATTTAA			661
Sbjct 716	CCGGTGGAGTTCCTATATATAATTAATACAATGTATTTTTATATATTCTCCTATTTAA			774
Query 662	ACCTACTTCAGTGCTCTTATCGAGTGTGTTGTGGGCCGGTACAATTACTTTGAACAAA			721
Sbjct 775	ACCTACTTCAGTGCTCTTCAACGAGTGTGTTGTGGGCCGGTACAATTACTTTGAACAAA			834
Query 722	TTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTCCAAATGCCTGAATATTTGTGCATGGAATAATGAAATA			781
Sbjct 835	TTAGAGTGCTTAAAGCAGGCTCCAAATGCCTGAATATTTGTGCATGGAATAATGAAATA			894
Query 782	AGACCTCTGTTCTACTTTCATT-GTTTTAGATCAAGAGGTAAATGATTAAATGAAGCAGT			840
Sbjct 895	AGACCTCTGTTCTACTTTCATTGGTTTTAGATCAAGGGGTAAATGATTAAATGAAGCAGT			954
Query 841	TTGGGGGCATTAGTTATTACGACGGCGAAGAGGGTAAAATCTTGAAC-GTCGTAAAGAAC			899
Sbjct 955	TTGGGGGCAT-AGT-ATTACGACG-CGA-GA-GGTGAAATCTTGGACCGTCGTAAAG-AC			1008
Query 900	TAACTTAAGCGAAAGCATT-GCCAAGAATGTTTTCTATA-TCA-GAC-GAAGTTAAA--G			953
Sbjct 1009	TAACTTAAGCGAAAGCATTGCCAAAGATGTTTTCTATAATCAAGCCCGAAATTCGATTG			1068
Query 954	GTTCGAAGGCATTCAAATACCGCCTTAGTTCTAAC-ATAACGAATGC-AGCTAGCA-TT			1010
Sbjct 1069	GTTCGAAGGCATCAGATACCGCCTAGTTCTAACATAACGA-TGCCAGCTAGCAATT			1127
Query 1011	GGGTG-AGCTTCTACTATG-CTTCTCAGTCCCTTCCCG--AA-CCAA-GCTTT-GGG-T			1062
Sbjct 1128	GGGTGAGCTACTACTATGGCTCTCTCAGTCGCTTCCCGGAAACCAAAGCTTTTGGGCT			1187
Query 1063	CCGGGAGA--TATG-TTGCAA-GCTGA--CTTA--GGA-TTGACG-AAG			1101
Sbjct 1188	CCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG			1236

Figura 2: Secuencia consenso obtenida con *los primers forward y reverse*. Resultados de la búsqueda de similitud entre la secuencia obtenida en esta tesis con la base de secuencias de nucleótidos del NCBI usando BLASTn para confirmar la identidad de la secuencia como perteneciente a *A. fraterculus*.

Capítulo 2

AFLPs en *Anastrepha fraterculus*- Comprobación de especificidad

>Afc6

```
NTGTCTTCGGCGCAGACGCACTAATATTGGTGTCCATTAGCTCG
CCATAGGACCTAAACAAAACCGAAAACGAGTTCATTCTGAAGC
TCAGGTGATGCTACTGCTACACTCGGTTCCCCGTCTCTTACTAAG
GTAGTCTCCAATCGAGCGCTGCAAGCGTGACACGTAACTCATAC
GAGTTTCAATATCAATTCTTATCATATTTTCATTGTAGTTGCATATGC
AAAGGTGTAATTGAATTGGTAC
```

>Af D6

```
TGNNAGCCCAGATGTCTAANTATTTGCCCAACGAGAGCAGGGC
AGCTGAGaaaaGGTTgCCAAGATGATTCCNCTTCGTCCTCAAN
ACAGCCNCNGNNAAAAGACTANAANCAACCGNNAGCCTCA
NCGCTTGGACACCTCACCTAACGGANAACGTCCGGNAAGGaT
ACcTACTGAATTGGtACGCAGtCA
```

>Af E6

```
TTGAATCTCAAAGAAAAGCCGTAATGAATGGGAGGGCAGGCAT
GACAACTTATTTTGCTGCATGACAACGCCAGGCCACATGTTGC
TAAATCGGGCCAGAAATATTTAGAGGAACTGAATTGAGAAATCT
TGCCCCACCCGCTGAATTG
```

>Af F6

```
TTGCATTCTTCTATCTCTATCTTGTCTTCAAATAGTCCGTGAGAT
TACTGATAATAATAAATTTTACTATTTTATGCACGTATGAAAAT
ACGTCTGTAGGCAAATAAGTTACACAAAGGCAAAAAGTACATTA
NCGTTTGAGTTCTTTGCTGAATTGNTACNCANCA
```

Figura 3: Secuencias nucleotídicas en formato fasta obtenidas de los fragmentos de AFLP de pooles de machos de *A. fraterculus* sp. 1 (Af-IGEAF).

Query: Af E6 Query ID: lcl|Query_29273 Length: 150
 >Zeugodacus cucurbitae strain USDA-PBARC White Pupae T1 contig006185,
 whole genome shotgun sequence
 Sequence ID: JRNW01006185.1 Length: 11309
 Range 1: 8357 to 8498

Score:66.2 bits(72), Expect:4e-09,
 Identities:101/143(71%), Gaps:1/143(0%), Strand: Plus/Plus

```

Query 7      CTCAAAGAAAAGCCGTAATGAATGGGAGGGCAGGCATGACAAACTTATTTTGTGTCATGA 66
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 8357   CTAAAAGAAAACGGTCAC-AGTACGAGGAAAAGACACGATAAAGTCATTCTCCAGCATGA 8415

Query 67     CAACGCCAGGCCACATGTGTCTAAATCGGGCCAGAAATATTTAGAGGAACGAATTGAGA 126
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 8416   CAATGCTCGGCCTCACGTCGCAAAGGTGGTCAAAAAATATTTGGAGAAGCTGAAATGTGA 8475

Query 127    AATCTTGCCCCACCCGCTGAATT 149
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 8476   GATCTTATCCCACCCGCGTATT 8498
    
```

Figura 4: Resultados del Blastn de la secuencias AfE6 (150 b).

**Bactrocera tryoni transposon Batmar11 putative
 DD34D transposase gene, complete cds**
**Sequence ID: [KX931004.1](#)Length: 1277Number of
 Matches: 1**
 Range 1: 851 to 992[GenBankGraphics](#)Next
 MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
241 bits(130)	9e-60	138/142(97%)	0/142(0%)	Plus/Plus

```

Query 1      CTAAAAGAAAACGGTCACAGTACGAGGAAAAGACACGATAAAGTCATTCTCCAGCATGAC 60
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 851     CTAAAAGAAAACGGCCACAGTACGAGGAAAAGACACGATAAAGTCATTCTCCAGCATGAC 910

Query 61     AATGCTCGGCCTCACGTCGCAAAGGTGGTCAAAAAATATTTGGAGAAGCTGAAATGTGAG 120
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 911     AATGCTCGGCCTCACGTCGCAAAGGTGGTCAAAAAATATTTGGAGACGCTGAAATGGGAG 970

Query 121    ATCTTATCCCACCCGCGTATT 142
           ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 971     ATCTTATCCCACCCGCGTATT 992
    
```

Figura 5: Resultado de Blastn de la secuencia de *Z. cucurbitae* (Sequence ID T1JRNW01006185.1 contig006185). Alineamiento del mejor hit obtenido contra las bases de datos nt.

Tabla 1: Scoring de bandas AFLP, corrida electroforética en gel de poliacrilamida 6 % (Acrilamida: bisacrilamida 19:1; 7 M urea)

Individuos	H1YC	H2YC	H3YC	H4YC	M1YC	M2YC	M3YC	M4YC	♀	♂
Bandas										
140 (1)	1	1			1	1	1	1	0	0
150 (2)	1	1			1	1	1	1	0	0
155 (3)	1	0			0	0	0	0	0	0
160 (4)	1	0			1	1	1	1	0	0
165 (5)	1	0			0	0	0	0	0	0
170 (6)	1	0			0	0	0	0	1	1
172 (7)	1	1			1	1	1	1	1	1
175 (8) doble	1	1			1	1	1	1	1	1
180 (9) doble	1	1			1	1	1	1	1	1
184 (10)	1	0			1	1	1	1	0	0
190 (11)	1	1			1	1	1	1	0	0
200 (12)	1	1			0	0	0	0	0	0
210 (13)	1	0			0	1	1	0	0	0
220 (14)	1	1			1	1	1	1	1	1
225 (15)	1	1			1	1	1	1	1	1
230 (16)	1	1			0	1	1	1	1	1
235 (17)	1	1			0	1	1	1	0	0
250 (18)	1	1			1	1	1	1	1	1
275 (19)	1	0			0	0	1	1	1	1
300 (20)	1	0			0	1	0	1	0	0
155 (1) doble	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
158 (2)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
180 (3) doble	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
184 (4)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
195 (5)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
200 (6)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
210 (7)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
245 (8)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
250 (9)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
285 (10)	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
140 (1)		0		1	1	1			1	
158 (2)		0		1	1	0			0	
161 (3)		0		1	1	0			0	
165 (4) doble		1		1	1	0			0	
175 (5)		0		1	1	0			1	
180 (6)		0		1	1	0			1	
183 (7)		0		1	1	0			0	
186 (8)		1		1	1	0			1	
190 (9)		1		1	1	0			1	
200 (10)		1		1	1	0			1	

M36-E32
No amplificado

M36-E36

M36-E40

220 (11)		1		1	1	0			0	
223 (12)		0		1	0	0			1	
247 (13)		1		1	1	0			1	
272 (14)		1		1	1	0			1	
280 (15)		0		1	1	0			0	
300 (16)		1		1	1	0			0	
330 (17)		1		1	1	0			0	
120 (1)	1	1	0	1	1	1	0	1		1
130 (2)	1	1	1	1	1	1	0	1		1
150 (3) doble	0	0	0	0	0	1	1	1		0
156 (4)	1	1	1	0	0	1	0	1		1
158 (5)	1	1	1	1	1	1	1	1		1
162 (6)	1	1	1	1	0	1	0	1		1
168 (7)	0	1	0	1	0	1	0	1		1
170 (8)	1	1	0	1	0	1	0	1		1
180 (9) doble	1	1	1	1	1	1	1	1		1
185 (10)	1	1	1	1	1	1	1	0		1
188 (11)	1	1	0	1	1	1	0	0		1
190 (12)	1	1	0	1	0	1	0	1		1
192 (13)	1	1	0	1	1	1	1	1		1
195 (14)	1	1	1	1	0	1	1	1		1
200 (15)	1	0	0	1	0	1	0	0		0
235 (17) doble	1	1	1	1	1	1	1	1		1
240 (18)	1	0	0	1	0	1	1	0		1
250 (19)	1	1	1	1	1	1	1	1		1
270 (20)	0	0	0	0	1	1	1	0		0

M36-E41

En la primera columna se indican las bandas identificadas, con su peso molecular aproximado. Entre paréntesis figura el número que se le colocó para identificarla y se aclara si la banda es simple o doble. 0= ausencia; 1= presencia. En la última columna, se indican los *primers* utilizados para la amplificación.

Bibliografía

- Abbott J. K., Nordén A. K. and Hansson B. (2017). Sex chromosome evolution: Historical insights and future perspectives. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284:2016.2806.
- Albert P. S., Zhang T., Semrau K., Rouillard J. M., Kao Y. H., Wang C. J. R., et al. (2019). Whole-chromosome paints in maize reveal rearrangements, nuclear domains, and chromosomal relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116(5): 1679–1685.
- Alberti A. C., Calcagno G., Saidman B. O. and Vilardi J. C. (1999). Analysis of the genetic structure of a natural population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92, 731–736.
- Alberti A. C., Rodríguez M. S., Gómez Cendra P., Saidman B. O. and Vilardi, J. C. (2002). Evidence indicating that Argentine populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) belong to a single biological species. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95(4): 505–512.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition.
- Allshire R. C. and Madhani H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19(4): 229-244.
- Altmanová M., Rovatsos M., Kratochvíl L. and Johnson Pokorná M. (2016). Minute Y chromosomes and karyotype evolution in Madagascan iguanas (Squamata: Iguania: Opluridae). *Biol. J. Linn. Soc.* 118, 618–633.
- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. and Lipman D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Aluja M., Rull J., Pérez-Staples D., Díaz-Fleischer F. and Sivinski, J. (2009). Random mating among *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) adults of geographically distant and ecologically distinct populations in Mexico. *Bull. Entomol. Res.* 99: 207–214.
- Asgharian H., Chang P. L., Mazzoglio P. J. and Negri I. (2014). *Wolbachia* is not all about sex: Male-feminizing *Wolbachia* alters the leafhopper *Zyginidia pullula* transcriptome in a mainly sex-independent manner. *Front. Microbiol.* 5: 1–10.
- Ashburner M., Carson H. and Thompson J. (1982). *The Genetics and biology of Drosophila* / edited by M. Ashburner, H.L. Carson and J.N. Thompson | National Library of Australia. Available at: <https://catalogue.nla.gov.au/Record/615945> [Accessed September 3, 2021].
- Ashman T.-L., Bachtrog D., Blackmon H., Goldberg E. E., Hahn M. W., Kirkpatrick M., et al. (2014). The tree of sex consortium. Tree of sex: a database of sexual systems. *Sci. Data* 1: 1–8.
- Avramova, Z. V. (2002). Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences. *Plant Physiol.* 129: 40–49.
- Ayala F. and Coluzzi M. (2005). Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (Suppl 1): 6535–6542.
- Bachmann G. E., Devescovi F., Nussenbaum A. L., Cladera J. L., Fernández P. C., Vera M. T., et al. (2017). Male sexual enhancement after methoprene treatment in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): A sustained response that does not fade away after sexual maturation. *J. Insect Physiol.* 101: 7-14.
- Bachmann G. E., Devescovi F., Nussenbaum A. L., Milla F. H., Shelly T. E., Cladera J. L., et al. (2019). Mate choice confers direct benefits to females of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *PLoS One* 14(6): 1-14.
- Bachmann G. E., Segura D. F., Devescovi F., Juárez M. L., Ruiz M. J., Vera M. T., et al. (2015). Male sexual behavior and pheromone emission is enhanced by exposure to guava fruit volatiles in *Anastrepha fraterculus*. *PLoS One* 10(4): 1-17.
- Bachtrog, D. (2006). A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16: 578–585.
- Bachtrog D. (2013). Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat. Rev. Genet.* 14, 113–124.
- Bachtrog D., Kirkpatrick M., Mank J. E., McDaniel S. F., Pires J. C., Rice W. R., et al. (2011). Are all sex chromosomes created equal? *Trends in Genetics* 27(9): 350-357.
- Bachtrog D., Mank J. E., Peichel C. L., Kirkpatrick M., Otto S. P., Ashman T. L., et al. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biol.* 12(7): 1–13.
- Badawi M., Moumen B., Giraud I., Grève P. and Cordaux, R. (2018). Investigating the molecular genetic basis of cytoplasmic sex determination caused by *Wolbachia* endosymbionts in terrestrial isopods.

- Genes (Basel)*. 9(6): 290-308.
- Bailey J. A., Baertsch R., Kent W. J., Haussler D. and Eichler, E. E. (2004). Hotspots of mammalian chromosomal evolution. *Genome Biol.* 5(R23).
- Baker R. H. and Wilkinson, G. S. (2010). Comparative genomic hybridization (CGH) Reveals a Neo-X chromosome and biased gene movement in Stalk-eyed flies (Genus *Teleopsis*). *PLoS Genet.* 6(9): e1001121.
- Balajee A. S. and Hande, M. P. (2018). History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 836: 3–12.
- Bardhan A. and Sharma, T. (2000). Dynamic of nucleolus organizer regions and karyotype evolution in Indian pygmy field mice. *Cytogenet. Cell Genet.* 91(1-4): 47–51.
- Barr N. B., Ruiz-Arce R., Farris R. E., Silva J. G., Lima K. M., Dutra V. S., et al. (2017). Identifying *Anastrepha* (Diptera; Tephritidae) species using DNA barcodes. *J. Econ. Entomol.* 111(1): 405–421.
- Barra V. and Fachinetti, D. (2018). The dark side of centromeres: types, causes and consequences of structural abnormalities implicating centromeric DNA. *Nat. Commun.* 9(1): 1–17.
- Basso A. (2003). Caracterización genética de los componentes del “complejo *Anastrepha fraterculus*” (*Anastrepha* spp. DIPTERA: Tephritidae, Trypetinae) (Wiedemann) mediante análisis de la variabilidad cromosómica. Ph Thesis, Universidad de Buenos Aires.
- Basso A. L. (2017). Reference Karyotypes and Chromosomal Variability: A Journey with Fruit Flies and the Key to Survival. *Chromosom. Abnorm. - A Hallmark Manif. Genomic Instab.* Chapter 9.
- Basso A. and Manso F. (1998). Are *Anastrepha fraterculus* chromosomal polymorphisms an isolation barrier? *Cytobios* 93: 103–111.
- Basso A., Pereyra A. and Bartoloni N. (2019). Chromosome-site interaction in the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied). 6: 57–61.
- Basso A., Sonvico A., Quesada-Allue L. and Manso F. (2003). Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American Fruit Fly *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 96(4): 1237-1244.
- Bates D., Mächler M., Bolker B. M. and Walker S. C. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48.
- Battisti A., Boato A. and Zanocco D. (1998). Two sibling species of the spruce web-spinning sawfly *Cephalcia fallenii* (Hymenoptera: Pamphiliidae) in Europe. *Syst. Entomol.* 23(2): 99–108.
- Bayega A., Djambazian H., Tsoumani K. T., Gregoriou M. E., Sagri E., Drosopoulou E., et al. (2020). De novo assembly of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) genome with linked-reads and long-read technologies minimizes gaps and provides exceptional y chromosome assembly. *BMC Genomics* 21: 1–21.
- Beckmann J. F., Ronau J. A. and Hochstrasser, M. (2017). A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nat. Microbiol.* 2: 17007.
- Bedo D. G. (1987). Polytene chromosome mapping in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 29: 598–611.
- Bell G. (1982). The masterpiece of nature, ed. Berkeley University of California.
- Berry A. J., Ajiokat J. W. and Kreitman M. (1991). Lack of Polymorphism on the *Drosophila* fourth chromosome resulting from selection. *Genetics* 129: 1111-1117.
- Beye M., Hasselmann M., Fondrk M., Page R. and Omholt, S. (2003). The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114: 419–429.
- Bione E., de Moura R. de C., de Carvalho R. and de Souza M. J. (2005). Karyotype, C-and fluorescence banding pattern, NOR location and FISH study of five Scarabaeidae (Coleoptera) species. *Genet. Mol. Biol.* 28: 376–381.
- Blackman, R. L. (1990). Association between karyotype and host plant in corn leaf aphid (Homoptera: Aphididae) in the northwestern United States. *Envir. Entomol.* 19, 609–611. Available at: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US9050940> [Accessed October 5, 2020].
- Blackman R. L. (1980). Chromosome numbers in the Aphididae and their taxonomic significance. *Syst. Entomol.* 5: 7–25.
- Blackman R. L., Brown P. and Eastop V. (1987). Problems in Pest Aphid Taxonomy: Can Chromosomes Plus Morphometries Provide Some Answers? in *Int. Symposium Population Structure, Genetics Taxon. Aphids.* (Smolenice), 233–238p.
- Blackmon H. and Demuth J. P. (2014). Estimating Tempo and Mode of Y Chromosome Turnover: Explaining Y Chromosome Loss With the Fragile Y Hypothesis. *Genetics* 197: 561–572.

- Blackmon H. and Demuth J. P. (2015). Genomic origins of insect sex chromosomes. *Curr. Opin. Insect Sci.* 7: 45–50.
- Blackmon H., Ross L. and Bachtrog D. (2017). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *J. Hered.* 108: 78–93.
- Bopp D., Saccone G. and Beye M. (2014). Sex determination in insects: Variations on a common theme. *Sex. Dev.* 8: 20–28.
- Botstein D., White R., Skolnick M. and Davis R. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331.
- Boykin L. M., Shatters R. G., Hall D. G., Dean D. and Beerli P. (2010). Genetic variation of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in Florida and the Caribbean using microsatellite DNA markers. *J. Econ. Entomol.* 103: 2214–2222.
- Bressa M. J., Papeschi A. G., Vítková M., Kubíková S., Fuková I., Pigozzi M. I., et al. (2009). Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus *dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenet. Genome Res.* 125: 292–305.
- Bridges C. (1935). Salivary chromosome maps: With a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.* 26: 60–64.
- Brito R. M., de Almeida Caixeiro A. P., das Graças Pompolo S. and Garcia Azevedo G. (2003). Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (hymenoptera, apidae, meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA3 and DA/DAPI. *Genet. Mol. Biol.* 26: 53–57.
- Britton-Davidian J., Cazaux B. and Catalan J. (2011). Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: micro-evolutionary insights. *Hered.* 1081(1): 68–74.
- Břízová R., Mendonça A. L., Vaníčková L., Mendonça A. L., Da Silva E. C., Tomčala, A., et al. (2013). Pheromone analyses of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Florida Entomol.* 96(3): 1107–1115.
- Břízová R., Vaníčková L., Fařarová M., Ekési S., Hoskovec M. and Kalinová, B. (2015). Analyses of volatiles produced by the African fruit fly species complex (Diptera, tephritidae). *Zookeys* 540:385–404.
- Brown E. J., Nguyen A. H. and Bachtrog D. (2020). The *Drosophila* Y chromosome affects heterochromatin integrity genome-wide. *Mol. Biol. Evol.* 37(10): 2808–2824.
- Brush S. G. (1978). Nettie M. Stevens and the discovery of sex determination by chromosomes. *Isis.* 69: 163–172.
- Bugrov A. G., Warchalowska-Śliwa E., Tatsuta H. and Akimoto, S. I. (2001). Chromosome polymorphism and C-banding variation of the brachypterous grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. (Orthoptera, Acrididae) in Hokkaido, Northern Japan. *Folia Biol. (Praha).* 49: 137–152.
- Bull J. (1983). *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Cáceres C., Segura D. F., Vera M. T., Wornoaiporn V., Cladera J. L. and Teal, P. (2009). Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera; Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biol. J. Linn. Soc.* 97:152–165.
- Canal N. A., Galeano-Olaya P. E. and Castañeda M. D. R. (2018). Phenotypic Structure of Colombian Populations of *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomol.* 101: 486–497.
- Canal N. A., Hernández-Ortiz V., Tigrero Salas J. O. and Selivon D. (2015). Morphometric study of third-instar larvae from five morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex (Diptera, tephritidae). *Zookeys* 540: 41–59.
- Canovai R., Caterini B., Contadini L. and Galleni, L. (1994). Karyology of the medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) mitotic complement: ASG bands. *Caryologia* 47: 241–247.
- Carabajal Paladino L., Papeschi A., Lanzavecchia S., Cladera J. and Bressa M. J. (2013). Cytogenetic characterization of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid wasp used as a biological control agent. *Eur. J. Entomol.* 110: 401–409.
- Carabajal Paladino L. Z. (2011). *Genética y citogenética de la determinación del sexo en Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Braconidae). PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires.
- Carraretto D., Nidchaya A., Di Cosimo A., Manni M., Scolari F., Valerio F., et al. (2020). Transcribed sex-specific markers on the Y chromosome of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *BMC Genet.* 21: 1–12.
- Cassagnau P. (1974). Les chromosomes polytènes de *Neanura monticola* Cassagnau (Collemboles). I. Polymorphisme écologique du chromosome X. *Chromosoma* 46: 343–363.

- Castañeda M. R., Selivon D., Hernández-Ortiz V., Soto A. and Canal, N. A. (2015). Morphometric divergence in populations of *Anastrepha obliqua* (Diptera, tephritidae) from Colombia and some neotropical locations. *Zookeys* 540: 61–81.
- Charlesworth B. (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science* 251: 1030–1033.
- Charlesworth B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.* 6: 149–162.
- Charlesworth B. and Charlesworth D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 355: 1563–1572.
- Charlesworth D. (2017). Evolution of recombination rates between sex chromosomes. *Genome Biology and Evolution* 9(9): 2461–2476.
- Charlesworth D., Charlesworth B. and Marais G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity (Edinb)*. 95: 118–128.
- Chen S. L., Dai S. M., Lu K. H. and Chang C. (2008). Female-specific doublesex dsRNA interrupts yolk protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 155–165.
- Cioffi M. B., Moreira-Filho O., Almeida-Toledo L. F. and Bertollo L. A. C. (2012). The contrasting role of heterochromatin in the differentiation of sex chromosomes: an overview from Neotropical fishes. *J. Fish Biol.* 80, 2125–2139.
- Cladera J. L. (1995). Self-Sexing Strain of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) Based on a Gene That Affects the Rate of Development. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 353–356.
- Cladera J. L. and Delprat M. A. (1995). Genetic and cytological mapping of a “Y–2” translocation in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Genome* 38: 1091–1097.
- Cladera J. L., Vilardi J. C., Juri M., Paulin L. E., Giardini M. C., Gómez Cendra P. V., et al. (2014). Genetics and biology of *Anastrepha fraterculus*: Research supporting the use of the sterile insect technique (SIT) to control this pest in Argentina. *BMC Genet.* 15.
- Clobert J., Baguette M., Benton T. and Bullock J. (2012). *Dispersal Ecology and Evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Coluzzi M., Sabatini A., Della Torre A., Di Deco M. A. and Petrarca V. (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science* 298:1415–1418.
- Coluzzi M., Sabatini A., Petrarca V. and Di Deco M. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 483–497.
- Conte C. A., Segura D. F., Milla F. H., Augustinos A., Cladera J. L., Bourtzis K., et al. (2019). *Wolbachia* infection in Argentinean populations of *Anastrepha fraterculus* sp1: Preliminary evidence of sex ratio distortion by one of two strains. *BMC Microbiol.* 19: 1–17.
- Cook L. G., Gullan P. J. and Trueman H. E. (2002). A preliminary phylogeny of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) based on nuclear small-subunit ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 25: 43–52.
- Cordaux R. and Batzer M. A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat. Rev. Genet.* 10: 691–703.
- Costa K. F., Brito R. M. and Miyazawa C. S. (2004). Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 27: 187–190.
- Dávila-Rodríguez M. I., Cortés-Gutiérrez E. I., López-Fernández C., Pita M., Mezzanotte R. and Gosálvez J. (2009). Whole-comparative genomic hybridization in domestic sheep (*Ovis aries*) breeds. *Cytogenet. Genome Res.* 124: 19–26.
- De Almeida Toledo L. F. and Foresti F. (2001). Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica* 111: 91–100.
- De Fátima Ruas C., Vanzela A. L. L., Santos M. O., Fregonezi J. N., Ruas P. M., Matzenbacher N. I., et al. (2005). Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 28(1): 129–139.
- de Freitas N. L., Al-Rikabi A. B. H., Bertollo L. A. C., Ezaz T., Yano C. F., de Oliveira E. A., et al. (2018). Early Stages of XY Sex Chromosomes Differentiation in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) Revealed by DNA Repeats Accumulation. *Curr. Genomics* 19: 216–226.
- De Lima I., Howse P. and Salles L. A. (1994). Reproductive behavior of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field studies. *Physiol. Entomol.* 19: 271–277.

- De Moraes R. L. R., Bertollo L. A. C., Marinho M. M. F., Yano C. F., Hatanaka T., Barby F. F., et al. (2017). Evolutionary relationships and cytotaxonomy considerations in the genus *pyrrhulina* (characiformes, lebiasinidae). *Zebrafish* 14: 536–546.
- de Moraes R. L. R., de Menezes Cavalcante Sassi F., Bertollo L. A. C., Ferreira Marinho M. M., Ferreira Viana P. F., Feldberg E., et al. (2021). Tracking the Evolutionary Trends Among Small-Size Fishes of the Genus *Pyrrhulina* (Characiforme, Lebiasinidae): New Insights From a Molecular Cytogenetic Perspective. *Front. Genet.* 12:1953.
- De Moraes R. L., Sember A., Bertollo L. A., De Oliveira E. A., Rab P., Hatanaka T., et al. (2019). Comparative cytogenetics and neo-Y formation in small-sized fish species of the genus *Pyrrhulina* (Characiformes, Lebiasinidae). *Front. Genet.* 10: 1–13.
- DeBach P. (1964). Biological control of insect pests and weeds. London: Chapman and Hall.
- Delaunay L. (1922). Comparative karyological studies of some Muscari and Bellevalia. *Bull. Tiflis Bot. Gard.* 2: 1–32.
- Devescovi F., Abraham S., Roriz A. K. P., Nolzaco N., Castañeda R., Tadeo E., et al. (2014). Ongoing speciation within the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex: The case of the andean morphotype. *Entomol. Exp. Appl.* 152: 238–247.
- Devescovi F., Conte C. A., Augustinos A., Martinez E. I. C., Segura D. F., Caceres C., et al. (2019). Symbionts do not affect the mating incompatibility between the Brazilian-1 and Peruvian morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex. *Sci. Rep.* 9: 1–12.
- Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M. and et al (2014). InfoStat versión 2014.
- Dias N. P., Zotti M. J., Montoya P., Carvalho I. R. and Nava D. E. (2018). Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. *Crop Prot.* 112: 187–200.
- Dias, V. S., Hallman, G. J., Cardoso, A. A. S. S., Hurtado, N. V., Rivera, C., Maxwell, F., et al. (2020). Relative Tolerance of Three Morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae) to Cold Phytosanitary Treatment. *J. Econ. Entomol.* 113, 1176–1182. doi:10.1093/jee/toaa027.
- Dias V. S. and Lucky, A. (2017). *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae). http://entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/tropical/south_american_fruit_fly.htm.
- Dias V. S., Silva J. G., Lima K. M., Petitinga C. S. C. D., Hernández-Ortiz V., Laumann R. A., et al. (2016). An integrative multidisciplinary approach to understanding cryptic divergence in Brazilian species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 117: 725–746.
- Dimitri P., Caizzi R., Giordano E., Carmela Accardo M., Lattanzi G., Biamonti G., et al. (2009). Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118: 419–435.
- Dobigny G., Ducroz J. F., Robinson T. J. and Volobouev V. (2004). Cytogenetics and cladistics. *Syst. Biol.* 53: 470–484.
- Dobzhansky T. (1941). Genetics and the Origin of Species, 2nd ed. New York: Columbia Univ. Press.
- Domingues A. M., Waldschmidt A., Andrade S., Souza V., Alves R. M., Silva Junior J., et al. (2005). Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genet. Mol. Biol.* 28: 390–393.
- Dorer D. R. and Henikoff S. (1994). Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77: 993–1002.
- Drosopoulou E., Nakou I., Šíchová J., Kubíčková S., Marec F. and Mavragani-Tsipidou P. (2012). Sex chromosomes and associated rDNA form a heterochromatic network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 140: 169–180.
- Drosopoulou E., Pantelidou C., Gariou-Papalexioy A., Augustinos A. A., Chartomatsidou T., Kyritsis G. A., et al. (2017). The chromosomes and the mitogenome of *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae): Two genetic approaches towards the *Ceratitis* FAR species complex resolution. *Sci. Rep.* 7: 1–14.
- Drouin G. and De Sa M. M. (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol. Biol. Evol.* 12: 481–493.
- Dunham M. J., Badrane H., Ferea T., Adams J., Brown P. O., Rosenzweig F., et al. (2002). Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 16144–16149.
- Dupim E. G., Goldstein G., Vanderlinde T., Vaz S. C., Krsticevic F., Bastos A., et al. (2018). An investigation of Y chromosome incorporations in 400 species of *Drosophila* and related genera. *PLOS Genet.* 14: e1007770.

- Eissenberg J. C. and Elgin S. C. (2000). The HP1 protein family: Getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 204–210.
- Elder J. F. and Turner B. J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q. Rev. Biol.* 70: 297–320.
- Ellegren H. (2011). Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nat. Rev. Genet.* 12(12): 157–166.
- Etchart V. J. (2009). Detección de polimorfismos moleculares en materiales de algodón (*Gossypium hirsutum* L) fenotípicamente contrastantes para la enfermedad azul y su mapeo en una población segregante. MSc Thesis.
- Ezaz T., Moritz B., Waters P., Graves J. A. M., Georges A. and Sarre S. D. (2009). The ZW sex microchromosomes of an Australian dragon lizard share no homology with those of other reptiles or birds. *Chromosome Res.* 17: 965–973.
- Fan Y. (2002). Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Fantini L. (2015). Evolución cromosómica y divergencia de especies en *Cebus* y *Ateles* (Primates: Platyrrhini) desde un enfoque citogenético molecular. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires.
- Fantini L., Mudry M. D. and Nieves M. (2011). Genome size of two cebus species (primates: platyrrhini) with a fertile hybrid and their quantitative genomic differences. *Cytogenet. Genome Res.* 135: 33–41.
- Felip A., Young W. P., Wheeler P. A. and Thorgaard G. H. (2005). An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247: 35–43.
- Ferguson-Smith M. A. (2015). History and evolution of cytogenetics. *Mol. Cytogenet.* 8: 1–8.
- Foster G. G., Whitten M. J., Prout T. and Gill, R. (1972). Chromosome rearrangements for the control of insect pests. *Science* 176: 875–880.
- 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, in *Sterile insect technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management.*, ed. J. H. and A. S. R. V.A. Dyck (Dordrecht), 427–451.
- Freilij D. (2022). Procesos microevolutivos y demográficos en la dinámica metapoblacional de la mosca sudamericana de la fruta *Anastrepha fraterculus*. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires.
- Freilij D., Ferreyra L. I., Vilardi J. C., Rodríguez A. I. and Gómez-Cendra P. (2022). Fine Scale Microevolutionary and Demographic Processes Shaping a Wild Metapopulation Dynamics of the South American Fruit Fly *Anastrepha fraterculus*. *Neotrop. Entomol.* 51: 339–355.
- Frias D., Hernandez-Ortiz V., Vaccaro N. C., Bartolucci A. F. and Salles L. A. (2006). Comparative morphology of immature stages of some frugivorous species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Isr. J. Entomol.* 35/36: 423–457.
- Fuková I., Nguyen P. and Marec F. (2011). Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* 48: 1083–1092.
- Fuller Z., Koury S., Phadnis N. and Schaeffer S. (2019). How chromosomal rearrangements shape adaptation and speciation: Case studies in *Drosophila pseudoobscura* and its sibling species *D. persimilis*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 28: 1283–1301.
- Funes C. F., Escobar L. I., Meneguzzi N. G., Ovruski S. M. and Kirschbaum D. S. (2017). Occurrence of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Organically Grown *Rubus* (Rosales: Rosaceae), in Two Contrasting Environments of Northwestern Argentina. *Florida Entomol.* 100: 672–674.
- Furman B. L. S., Metzger D. C. H., Darolti I., Wright A. E., Sandkam B. A., Almeida P., et al. (2020). Sex Chromosome Evolution: So Many Exceptions to the Rules. *Genome Biol. Evol.* 12: 750–763.
- Furo I. de O., Kretschmer R., O'Brien P. C. M., Pereira J. C., Ferguson-Smith M. A. and de Oliveira E. H. C. (2020). Phylogenetic analysis and karyotype evolution in two species of core guiformes: *Aramides cajaneus* and *Psophia viridis*. *Genes (Basel)*. 11.
- Fyodorova M., Zhantiev R. and Gokhman V. (1991). Karyotypes of the mole-cricket (Orthoptera, Gryllotalpidae) of the European part of the USSR and the caucassus. *Zool. zhurnal* 70: 43–50.
- García-Martínez V., Hernández-Ortiz E., Zepeta-Cisneros C. S., Robinson A. S., Zacharopoulou A. and Franz, G. (2009). Mitotic and polytene chromosome analysis in the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Genome* 52: 20–30.
- Gariou-Papalexioi A., Chrysanthis G., Mintzas A. C. and Zacharopoulou A. (1999). Patterns of puffing

- activity in the salivary gland polytene chromosomes of the medfly *Ceratitis capitata*, during larval and prepupal development. *Genome* 42: 919–929.
- Gariou-Papalexiou A., Giardini M. C., Augustinos A. A., Drosopoulou E., Lanzavecchia S. B., Cladera J. L., et al. (2016). Cytogenetic analysis of the south American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) species complex: Construction of detailed photographic polytene chromosome maps of the argentinian Af. sp.1 member. *PLoS One* 11.
- Gariou-Papalexiou A., Gourzi P., Delprat A., Kritikou D., Rapti K., Chrysanthakopoulou B., et al. (2002). Polytene chromosomes as tools in the genetic analysis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genetica*, 59–71.
- Gaspar V. P., Shimauti E. L. T. and Fernandez M. A. (2014). Chromosomal localization and partial sequencing of the 18S and 28S ribosomal genes from *Bradysia hygida* (Diptera: Sciaridae). *Genet. Mol. Res.* 13: 2177–2185.
- Gavrilov I. A. and Kuznetsova V.G. (2004). New Data on the Scale Insect (Homoptera: Coccinea) Fauna of European Russia, Their Taxonomy and Cytogenetics. in *X International Symposium on Scale Insect Studies*, 19–34.
- Gerbault-Seureau M., Cacheux L. and Dutrillaux B. (2018). The Relationship between the (In-)Stability of NORs and Their Chromosomal Location: The Example of Cercopithecidae and a Short Review of Other Primates. *Cytogenet. Genome Res.* 153: 138–146.
- Giardini M. C. (2006). *Anastrepha fraterculus*: Estudios citológicos de reordenamientos cromosómicos espontáneos e inducidos en una colonia de laboratorio. Bachellor Thesis, Universidad de Buenos Aires.
- Giardini M. C., Milla F. H., Lanzavecchia S., Nieves, M. and Cladera J. L.. (2015). Sex chromosomes in mitotic and polytene tissues of *Anastrepha fraterculus*: a review. *Zookeys*, 540: 83–94.
- Giardini M. C., Milla F. H., Conte C. A., Cladera J. L., Lanzavecchia S. B. and Nieves, M. (2012). Localización de los cromosomas sexuales de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) en tejidos politénicos. in *XV Congreso Latinoamericano de Genética, XLI Congreso Argentino de Genética, XLV Congreso de la Sociedad de Genética de Chile, II Reunión regional SAG-Litoral*, 1.
- Giardini M. C., Milla F. H., Conte C. A., Lanzavecchia S. B., and Cladera, J. L. (2009a). Localización de los genes ribosomales en cromosomas mitóticos de *Anastrepha fraterculus* (WIED) mediante Hibridación *in situ* Fluorescente. in *XXXV Congreso Argentino de Genética*.
- Giardini, M. C., Milla, F. H., and Manso, F. C. (2006). Polimorfismo de las poblaciones de colonización y el manejo previo necesario para su uso. in *XXXII Congreso Argentino de Genética*.
- Giardini M. C., Milla F. and Manso F. C. (2009b). Structural map of the polytene chromosomes from the salivary glands of South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* Wied. *Caryologia*, 62: 204–212.
- Gilchrist A. S., Cameron E. C., Sved J. A. and Meats A. W. (2012). Genetic consequences of domestication and mass rearing of pest fruit fly *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 105: 1051–1056.
- Gilchrist A. S., Shearman D. C. A., Frommer M., Raphael K. A., Deshpande N. P., Wilkins M. R., et al. (2014). The draft genome of the pest tephritid fruit fly *Bactrocera tryoni*: Resources for the genomic analysis of hybridising species. *BMC Genomics* 15.
- Goday C., Selivon D., Perondini A. L. P., Greciano P. G. and Ruiz, M. F. (2006). Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha species* (Diptera, Tephritidae). *Cytogenet. Genome Res.* 114: 70–76.
- Gokhman V. E. (1997). Differential Chromosome Staining in Parasitic Wasps of the Genus *Dirophanes* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Zool Zh* 76: 65–68.
- Gokhman V. E., de Bello Cioffi M., König C., Pollmann M., Gantert C., Krogmann L., et al. (2019). Microdissection and whole chromosome painting confirm karyotype transformation in cryptic species of the *Lariophagus distinguendus* (Förster, 1841) complex (Hymenoptera: Pteromalidae). *PLoS One* 14, e0225257.
- Gokhman V. E. and Kuznetsova V. G. (2006). Comparative insect karyology: Current state and applications. *Entomol. Rev.* 86: 352–368.
- Golub N. V., Nokkala S. and Kuznetsova V. G. (2004). Holocentric chromosomes of psocids (insecta, psocoptera) analysed by C-banding, silver impregnation and sequence specific fluorochromes CMA 3 and DAPI. *Folia Biol. (Praha)*. 52: 143–149.
- Gómez-Cendra P. V., Paulin L. E., Oronõ L., Ovruski S. M. and Vilardi J. C. (2016). Morphometric differentiation among *Anastrepha fraterculus* (diptera: Tephritidae) exploiting sympatric alternate hosts. *Environ. Entomol.* 45: 508–517.

- Gomez Cendra P., Calcagno G., Belluscio L. and Vilardi J. C. (2011). Male Courtship Behavior of the South American Fruit Fly, *Anastrepha fraterculus*, from an Argentinean Laboratory Strain. *J. Insect Sci.* 11: 1–18.
- Gonzalez J., Vargas C. and Jara, V. (1971). Studies about the application of the technique of using sterile males to control the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied). *Rev. Peru. Entomol.* 14: 66–86.
- Gosálvez J., Crespo F., Vega-Pla J. L., López-Fernández C., Cortés-Gutiérrez E. I., Devila-Rodriguez M. I., et al. (2010). Shared Y chromosome repetitive DNA sequences in stallion and donkey as visualized using whole-genomic comparative hybridization. *Eur. J. Histochem.* 54: 10–13.
- Graves J. A. M. (2006). Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* 124: 901–914.
- Grozeva S., Kuznetsova V. G. and Nokkala S. (2004). Patterns of chromosome banding in four nabid species (Heteroptera, Cimicomorpha, Nabidae) with high chromosome number karyotypes. *Hereditas* 140: 99–104.
- Guest W. and Hsu T. (1973). A new technique for preparing *Drosophila* neuroblast chromosomes. *Drosoph. Inf. Serv.* 50.
- Guillen D. and Sanchez R. (2007). Area- Wide control of Insect pest., eds. M. J. B. Vreysen, A. S. Robinson, and J. Hendrichs.
- Gunderina L., Kiknadze I., Istomina A. et al (2005). Divergence of the Polytene Chromosome Banding Sequence as Reflection of Evolutionary Changes in the Linear Genome Structure. *Genetika* 41, 187–195.
- Hall T. A. (1999). BioEdit A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harvey S., Masabanda J., Carrasco L., Bromage N., Penman D. and Griffin D. (2002). Molecular-cytogenetic analysis reveals sequence differences between the sex chromosomes of *Oreochromis niloticus*: Evidence for an early stage of sexchromosome differentiation. *Cytogenet. Genome Res.* 97, 76–80.
- He W., Liu Y., Smith M. and Berns, M. W. (1997). Laser microdissection for generation of a human chromosome region-specific library. *Microsc. Microanal.* 3: 47–52.
- Hedrick P. W. (1981). The Establishment of Chromosomal Variants. *Evolution (N. Y.)* 35: 322.
- Hendrichs J., Vera M. T., De Meye M. and Clarke A. R. (2015). Resolving cryptic species complexes of major tephritid pests. *Zookeys* 540: 5–39.
- Henning F., Moysés C. B., Calcagnotto D., Meyer A. and De Almeida-Toledo L. F. (2011). Independent fusions and recent origins of sex chromosomes in the evolution and diversification of glass knife fishes (Eigenmannia). *Heredity (Edinb.)* 106: 391–400.
- Hernandez-Ortiz V. and Aluja M. (1993). Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. Species list of the Neotropical genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) with notes on distribution and host plants. *Folia Entomológica Mex.* 33, 88–105.
- Hernandez-Ortiz V., Bartolucci A. F., Morales-Valles P., Fras D., Selivon D., et al. (2012). Cryptic Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera: Tephritidae): A multivariate approach for the recognition of South American morphotypes. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 105: 305–318.
- Hernández-Ortiz V., Canal N. A., Tigrero Salas J. O., Ruiz-Ruano F., Dzul-Cauich J. F., Ruíz-Hurtado F. M., et al. (2015). Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Mesoamerican and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). *Zookeys* 540: 95–124.
- Hernández-Ortiz V., Gómez-Anaya J. A., Sánchez A., McPherson B. A. and Aluja, M. (2004). Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bull. Entomol. Res.* 94: 487–499.
- Herrera J. C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agron. Colomb.* 25, 26–35.
- Hewitt G. M. (1979). Animal Cytogenetics, in *Vol. 3 Part 1* (Berlin–Stuttgart: Gebrüder Borntraeger).
- Hill R. J. and Rudkin G. T. (1987). Polytene chromosomes: The status of the band–interband question. *BioEssays* 7: 35–40.
- Hobza R., Kubat Z., Cegan R., Jesionek W., Vyskot B. and Kejnovsky E. (2015). Impact of repetitive DNA on sex chromosome evolution in plants. *Chromosom. Res.* 23: 561–570.
- Hobza R., Lengerova M., Cernohorska H., Rubes J. and Vyskot B. (2004). FAST-FISH with laser beam

- microdissected DOP-PCR probe distinguishes the sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Chromosom. Res.* 12: 245–250.
- Hoisington D., Khairallah M. and González de León D. (1994). *CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. 2nd edition. , ed. CIMMYT Mexico.
- Hoshiba H. and Imai H. T. (1993). Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Japanese J. Entomol.* 61: 465–492.
- Hou L., Xu M., Zhang T., Xu Z., Wang W., Zhang J., et al. (2018). Chromosome painting and its applications in cultivated and wild rice. *BMC Plant Biol.* 18: 1–10.
- Hoyer-Fender S., Costanzi C. and Pehrson J. R. (2000). Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp. Cell Res.* 258: 254–260.
- Hua L. L. and Mikawa T. (2018). Chromosome Painting of Mouse Chromosomes. *Methods Mol. Biol.* 1752, 133.
- IAEA (2020). Control de plagas de insectos. Available at: <https://www.iaea.org/es/temas/tecnica-de-los-insectos-esteriles>
- Jaldo H. E., Gramajo M. C. and Willink E. (2001). Mass rearing of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae): A preliminary strategy. *Florida Entomol.* 84: 716–718.
- Jeffries D. L., Lavanchy G., Sermier R., Sredl M. J., Miura I., Borzée A., et al. (2018). A rapid rate of sex-chromosome turnover and non-random transitions in true frogs. *Nat. Commun.* 9(9): 1–11.
- Juárez M. L., Pimper L. E., Bachmann G. E., Conte C. A., Ruiz M. J., Goane L., et al. (2019). Gut bacterial diversity and physiological traits of *Anastrepha fraterculus* Brazilian-1 morphotype males are affected by antibiotic treatment. *BMC Microbiol.* 19: 1–17.
- Kageyama D. and Traut W. (2004). Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapularis*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271: 251–258.
- Kaiser V. B. and Bachtrog D. (2010a). Evolution of Sex Chromosomes in Insects. *Annu. Rev. Genet.* 44: 91–112.
- Kaiser V. and Bachtrog D. (2010b). Evolution of Sex Chromosomes in Mammals. *Annu. Rev. Genet.* 44.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O. P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J. W., Waldman F., et al. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258: 818–821.
- Kang L., George P., Price D. K., Sharakhov I. and Michalak P. (2017). Mapping Genomic Scaffolds to Chromosomes Using Laser Capture Microdissection in Application to Hawaiian Picture-Winged *Drosophila*. *Cytogenet. Genome Res.* 152: 204–212.
- Kejnovsky E., Hobza R., Cermak T., Kubat Z. and Vyskot B. (2009). The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Hered.* 1026(102): 533–541.
- King R. (2006). *A dictionary of genetics (7th edition)*. 7th ed. Oxford University Press (OUP) Available at: <https://archive.org/details/dictionarygeneti02king/page/n254/mode/2up>.
- Knipling E. F. (1955). Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *J. Econ. Entomol.* 48: 459–462.
- Kondo M., Nanda I., Hornung U., Schmid M. and Scharl M. (2004). Evolutionary Origin of the Medaka Y Chromosome. *Curr. Biol.* 14: 1664–1669.
- Kopps P. (1993). SILVER SEQUENCE™ DNA Sequencing System *.
- Kouzarides T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128: 693–705.
- Krimbas C. and Powell J. (1992). *Drosophila Inversion Polymorphism*. 1st. Edition. Boca Ratón: CRC Press.
- Kuznetsova V. G., Maryńska-Nadachowska A. and Nokkala S. (1997). C-banded karyotype of psyllid species *Aphalara Calthae* (L.) (Psylloidea, Homoptera, Insecta). *Cytologia* 62, 237–239.
- Kuznetsova V. G., Maryńska-Nadachowska A. and Nokkala S. (2003). A new approach to the auchenorrhyncha (hemiptera, insecta) cytogenetics: Chromosomes of the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (L.) examined using various chromosome banding techniques. *Folia Biol. (Praha)*. 51: 33–40.
- Kuznetsova V. G., Westendorff M. and Nokkala S. (2001). Patterns of the Chromosome Banding in the Sawfly Family Tenthredinidae (Hymenoptera, Symphyta). *Caryologia* 54.
- Lagos D., Koukidou M., Savakis C. and Komitopoulou K. (2007). The transformer gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol. Biol.* 16: 221–230.
- Lagos D., Ruiz M. F., Sánchez L. and Komitopoulou K. (2005). Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 348: 111–121.
- Landeon E. L. and Presgraves D. C. (2013). Evolution: From autosomes to sex chromosomes- and back. *Curr. Biol.* 23: 848–850.

- Landmann F., Orsi G. A., Loppin B. and Sullivan W. (2009). *Wolbachia*-Mediated Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Impaired Histone Deposition in the Male Pronucleus. *PLoS Pathog.* 5, e1000343.
- Lanzavecchia S. B., Juri M., Bonomi A., Gomulski L. M., Scannapieco A. C., Segura D. F., et al. (2014). Microsatellite markers from the “South American fruit fly” *Anastrepha fraterculus*: A valuable tool for population genetic analysis and SIT applications. *BMC Genet.* 15: 1–8.
- Lassy C. W. and Karr T. L. (1996). Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mech. Dev.* 57: 47–58.
- Leitch I. J. and Heslop-Harrison J. S. (1992). Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by in situ hybridization. *Genome* 35: 1013–1018.
- Levan A., Fredga K. and Sandberg A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–20.
- Lifschitz E. and Cladera J. L. (1989). “Cytogenetics and sex determination,” in *FruitFlirs Their Biology, Natural Energies and Control*, eds. A. S. Robinson and G. Hooper (Amsterdam: Elsevier), 3–11.
- Lifschitz E., Manso F. and Basso A. (1999). “Karyotype study of the South American Fruit Fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.) in Argentina,” in *The South American Fruit Fly, Anastrepha fraterculus (Wied.): Advances in Artificial Rearing, Taxonomic status and Biological Studies*, ed. IAEA (Vienna).
- Liu J., Ali M. and Zhou Q. (2020). Establishment and evolution of heterochromatin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1476, 59.
- Liu J., Yi M., Zhao G., Zhou F., Wang D. and Yu Q. (2002). Sex chromosomes in the spiny eel (*Mastacembelus aculeatus*) revealed by mitotic and meiotic analysis. *Cytogenet. Genome Res.* 98: 291–297.
- Ludueña C. (2010). Agricultural Productivity Growth, Efficiency Change and Technical Progress in Latin America and the Caribbean. Available at: www.iadb.org.
- Malavasi A., Morgante J. S. and Prokopy R. (1983). Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) flies on host and non host trees. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76: 286–292.
- Mandrioli M., Bizzaro D., Giusti M., Manicardi G. C. and Bianchi U. (2011). The role of rDNA genes in X chromosome association in the aphid *Acyrtosiphon pisum*. <https://doi.org/10.1139/g98-145> 42, 381–386. doi:10.1139/G98-145.
- Manni M., Lima K. M., Guglielmino C. R., Lanzavecchia S. B., Juri, Vera M. T., et al. (2015). Relevant genetic differentiation among Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera, tephritidae). *Zookeys* 540, 157–173.
- Manso F. and Basso A. (1999). “Notes on the present situation of *Anastrepha fraterculus* in Argentina,” in *The South American Fruit Fly, Anastrepha fraterculus (Wied.): Advances in Artificial Rearing, Taxonomic status and Biological Studies*, ed. IAEA (Vienna), 147–162. Available at: http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:30007857.
- Marchal J. A., Acosta M. J., Nietzel H., Sperling K., Bullejos M., Díaz De La Guardia R., et al. (2004). X chromosome painting in *Microtus*: origin and evolution of the giant sex chromosomes. *Chromosome Res.* 12: 767–776.
- Markova M., Michu E., Vyskot B., Janousek B. and Zluvova J. (2007). An interspecific hybrid as a tool to study phylogenetic relationships in plants using the GISH technique. *Chromosom. Res.* 105.
- Mastrangelo T., Kovaleski A., Maset B., Lourdes M. De, Costa, Z., Barros, C., et al. (2021). Improvement of the Mass-Rearing Protocols for the South American Fruit Fly for Application of the Sterile Insect Technique. *Insects* 12: 622
- Mavragani-Tsipidou P., Karamanlidou G., Zacharopoulou A., Koliais S. and Kastritsis C. (1992). Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 35: 373–378.
- Mayr E. (1942). *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia Univ. Press.
- Mayr E. (1963). *Animal species and evolution.* , ed. Harvard University Press Cambridge.
- Mayr E. (1970). *Populations, species and evolution.* , ed. Harvard University Press London: Oxford University Press.
- Meccariello A., Salvemini M., Primo P., Hall B., Koskinioti P., Dal'ková M., et al. (2019). Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests. *Science*, 365: 1457–1460.
- Mehta C. R. and Patel N. R. (1983). A Network Algorithm for Performing Fisher's Exact Test in $r \times c$ Contingency Tables. *J. Am. Stat. Assoc.* 78, 427.
- Mengual X., Kerr P., Norrbom A. L., Barr N. B., Lewis M. L., Stapelfeldt A. M., et al. (2017). Phylogenetic relationships of the tribe Toxotrypanini (Diptera: Tephritidae) based on molecular characters. *Mol.*

- Phylogenet. Evol.* 113: 84–112.
- Meza J. S., Bourtzis K., Zacharopoulou A., Gariou-papalexioy A. and Cáceres C. (2020). Development and characterization of a pupal-colour based genetic sexing strain of *Anastrepha fraterculus* sp. 1 (Diptera: Tephritidae). *BMC Genet.* 21.
- Michelmore R. W., Paran I. and Kesseli R. V. (1991). Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 9828–9832.
- Miller K. G. and Sollner-Webb B. (1981). Transcription of mouse rRNA genes by RNA polymerase I: In vitro and in vivo initiation and processing sites. *Cell* 27: 165–174.
- Ministerio del Interior de la República Argentina (2018). Region Del Noreste Características. http://www.mininterior.gov.ar/municipios/gestion/regiones_archivos/NEA.pdf.
- Ministerio del Interior y Transporte (2014). Region del Noroeste. http://www.mininterior.gov.ar/municipios/gestion/regiones_archivos/NOA.pdf.
- Molina-Nery M. C., Ruiz-Montoya L., Zepeda-Cisneros C. S. and Liedo P. (2014). Genetic Structure of Populations of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) in Mexico.
- Montiel E. E., Badenhorst D., Tamplin J., Burke R. L. and Valenzuela N. (2017). Discovery of the youngest sex chromosomes reveals first case of convergent co-option of ancestral autosomes in turtles. *Chromosoma* 126: 105–113.
- Morgante J. S. and Malavasi A. (1985). Genetics variability in populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Tephritidae). *Rev. Bras. Genet.* 8: 241–247.
- Morgante J. S., Malavasi A. and Bush G. L. (1980). Biochemical systematics and evolutionary relationships of neotropical *Anastrepha*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73: 622–630.
- Mueller U. G. and Wolfenbarger L. L. R. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14: 389–394.
- Munhenga G., Brooke B. D., Chirwa T. F., Hunt R. H., Coetzee M., Govender D., et al. (2011). Evaluating the potential of the sterile insect technique for malaria control: Relative fitness and mating compatibility between laboratory colonized and a wild population of *Anopheles arabiensis* from the Kruger National Park, South Africa. *Parasites and Vectors* 4.
- Murillo T. and Jiron L. F. (1994). Egg Morphology of *Anastrepha obliqua* and Some Comparative Aspects with Eggs of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomol.* 77: 342.
- Nanda I., Volff J. N., Weis S., Körting C., Froschauer A., Schmid M., et al. (2000). Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* 109: 173–180.
- Nechayeva G. A., Kuznetsova V. G. and Nokkala S. (2004). New Data on the Karyotype of *Pseudococcus viburni* (Sign.) (Homoptera, Coccinea). *Entomol. Rev.* 84: 393–400.
- Neusser M., Münch M., Anzenberger G. and Müller S. (2005). Investigation of marmoset hybrids (*Cebuella pygmaea* x *Callithrix jacchus*) and related Callitrichinae (Platyrrhini) by cross-species chromosome painting and comparative genomic hybridization. *Cytogenet. Genome Res.* 108: 191–196.
- Nieuwenhove G. and Ovruski S. (2011). Influence of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larval instars on the production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) progeny and their sex ratio. *Florida Entomol.* 94: 863–868.
- Nieves M. (2007). Heterocromatina y Evolución cromosómica en Primates Neotropicales. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires.
- Nieves M., Mühlmann M. and Mudry M. D. (2005). Heterochromatin and chromosome evolution: a FISH probe of *Cebus apella paraguayanus* (Primate: Platyrrhini) developed by chromosome microdissection. *Genet. Mol. Res.* 4: 675–683.
- Nieves M., Mühlmann M. and Mudry M. D. (2010). *Cebus paraguayanus* and *Cebus nigratus* (Primates, Platyrrhini): A Comparative Genomic Hybridization Analysis. *Cytogenet. Genome Res.* 128: 214–220.
- Normark B. B. (2003). The Evolution of Alternative Genetic Systems in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 397–423.
- Norrbom A. L. (2004). Host plant database for *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Diptera: Tephritidae: Toxotrypani). Diptera Data Dissemination Disk.
- Norrbom A. L., Zucchi R. A. and Hernandez-Ortiz V. (1999). Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology, in *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*, eds. M. Aluja and A. L. Norrbom (Boca Ratón: CRC press),

- 299–342p.
- Ohno S. (1967). *Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Oroño L., Paulin L., Alberti A. C., Hilal M., Ovruski S., Vilardi J. C., et al. (2013). Effect of Host Plant Chemistry on Genetic Differentiation and Reduction of Gene Flow Among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) Populations Exploiting Sympatric, Synchronic Hosts. *Environ. Entomol.* 42: 790–798.
- Ovruski S., Colin C., Soria A., Oroño L. E. and Schliserman P. (2003). Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. *Rev. la Soc. Entomológica Argentina* 62: 49–59.
- Painter T. S. (1934). A New Method for the Study of Chromosome Aberrations and the Plotting of Chromosome Maps in *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 19: 175–188.
- Palmer D. H., Rogers T. F., Dean R. and Wright A. E. (2019). How to identify sex chromosomes and their turnover. *Mol. Ecol.* 28: 4709–4724.
- Palomeque T., Chica E., Cano M. A. and de la Guardia R. D. (1988). Karyotypes, C-Banding and Chromosomal Location of Active Nucleolar Organizing Regions in *Tapinoma* (Hymenoptera, Formicidae). *Genome* 30: 277–280.
- Pane A., Salvemini M., Delli Bovi P., Polito C. and Saccone G. (2002). The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* 129: 3715–3725.
- Papanicolaou A., Schetelig M. F., Arensburger P., Atkinson P. W., Benoit J. B., Bourtzis K., et al. (2016). The whole genome sequence of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), reveals insights into the biology and adaptive evolution of a highly invasive pest species. *Genome Biology* 17: 192.
- Pardue M. L. and Gall J. G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64: 600–604.
- Park Y. and Kuroda M. I. (2001). Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. *Science*, 293: 1083–1085.
- Parreño M. A., Scannapieco A. C., Remis M. I., Juri M., Vera M. T., Segura D. F., et al. (2014). Dynamics of genetic variability in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) during adaptation to laboratory rearing conditions. *BMC Genet.* 15, S14.
- Peichel C. L., Ross J. A., Matson C. K., Dickson M., Grimwood J., Schmutz J., et al. (2004). The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr. Biol.* 14: 1416–1424.
- Peil A., Flachowsky H., Schumann E. and Weber W. E. (2003). Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 102–109.
- Penagos-Puig A. and Furlan-Magaril M. (2020). Heterochromatin as an Important Driver of Genome Organization. *Front. Cell Dev. Biol.* 8: 1–10.
- Pennell M. W., Mank J. E. and Peichel C. L. (2018). Transitions in sex determination and sex chromosomes across vertebrate species. *Mol. Ecol.* 27: 3950–3963.
- Petit-Marty N., Vera M. T., Calcagno G., Cladera J. L., Segura D. F., Allinghi A., et al. (2004). Sexual behavior and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 1320–1327.
- Pinkel D. and Albertson D. G. (2005). Comparative genomic hybridization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6: 331–354.
- Pinkel D., Straume T. and Gray J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 2934–2938.
- Pita S., Panzera F., Sánchez A., Palomeque T. and Lorite P. (2017). Chromosome Painting in Triatomine Insects Reveals Shared Sequences Between X Chromosomes and Autosomes. *J. Med. Entomol.* 54: 44–49.
- Polukonova N. and Belyaina S. (2002). On the Possible Hybridogenic Origin of *Chironomus usenicus* Loginova et Beljanina (Chironomidae, Diptera). *Genetika* 38: 1635–1640.
- Polukonova N., Belyanina S. I., Michailova P. V. and Golygina, V. (2005). Comparative Analysis of the Karyotypes and Karyopools of Midges *Chironomus nuditarsis* and *Ch. curabilis* (Chironomidae, Diptera). *Entomol. Rev.* 84: 587–597.
- Ponnikas S., Sigeman H., Abbott J. K. and Hansson B. (2018). Why Do Sex Chromosomes Stop Recombining? *Trends Genet.* 34: 492–503.

- Potter S., Bragg J. G., Blom M. P. K., Deakin J. E., Kirkpatrick M., Eldridge M. D. B., et al. (2017). Chromosomal speciation in the genomics era: Disentangling phylogenetic evolution of rock-wallabies. *Front. Genet.* 8: 1–18.
- Prezotto L. F., Perondini A. L. P., Hernández-Ortiz V., Frías D. and Selivon D. (2019). What can integrated analysis of morphological and genetic data still reveal about the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex? *Insects* 10.
- Puppels G. J. (1999). Confocal Raman Microspectroscopy. *Fluoresc. Lumin. Probes Biol. Act.*, 377–406.
- Rábová M., Ráb P. and Ozouf-Costaz C. (2001). Extensive polymorphism and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in a loach fish, *Cobitis vardarensis* (Ostariophysi, Cobitidae) detected by different banding techniques and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica* 111: 413–422.
- Radu M., Rossler Y. and Koltin Y. (1975). The chromosomes of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Weid): karyotype and chromosomal organization. *Cytologia (Tokyo)*. 40: 823–828.
- Redi C. A., Garagna S., Zacharias H., Zuccotti M. and Capanna E. (2001). The other chromatin. *Chromosoma* 110: 136–147.
- Reed K., Bohlander S. and Phillips R. (1995). Microdissection of the Y chromosome and fluorescence in situ hybridization analysis of the sex chromosomes of lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Chromosom. Res.* 3: 221–226.
- Reyes Lerma A. C., Štáhlavský F., Seiter M., Carabajal Paladino L. Z., Divišová K., Forman M., et al. (2021). Insights into the Karyotype Evolution of Charinidae, the Early-Diverging Clade of Whip Spiders (Arachnida: Amblypygi). *Anim.* 11: 3233.
- Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C. and Berg P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237–251.
- Robinson A. S. (2002). Mutations and their use in insect control. *Rev. Mutat. Res.* 511: 113–132.
- Rodriguez A. I., Ferreyra L. I., Lanzavecchia S. B., Gómez Cendra P. and Vilardi J. C. (2019). Cryptic genetic structure in an Argentinian population of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) evidenced by SSR markers and quantitative traits. *Eur. J. Entomol.* 116: 109–122.
- Roriz A. K. P., Japyassú H. F., Cáceres C., Vera M. T. and Joachim-Bravo, I. S. (2019). Pheromone emission patterns and courtship sequences across distinct populations within *Anastrepha fraterculus* (Diptera-Tephritidae) cryptic species complex. *Bull. Entomol. Res.* 109: 408–417.
- Ross L. and Blackmon H. (2016). Sex Determination. *Encycl. Evol. Biol.* 4: 81–88.
- Rudkin G. and Stollar B. (1977). High resolution detection of DNA–RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265: 472–473.
- Ruiz-Arce R., Owen C. L., Thomas D. B., Barr N. B. and McPheron B. A. (2015). Phylogeographic Structure in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Populations Inferred With mtDNA Sequencing. *J. Econ. Entomol.* 108: 1324–1336.
- Ruiz-Montoya L. and Núñez-Farfán J. (2013). Testing local host adaptation and phenotypic plasticity in a herbivore when alternative related host plants occur sympatrically. *PLoS One* 8, e79070.
- Ruiz-Montoya L., Vallejo R. V., Haymer D. and Liedo P. (2020). Genetic and ecological relationships of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) populations in Southern Mexico. *Insects* 11: 1–18.
- Ruiz M. F., Milano A., Salvemini M., Eirín-López J. M., Perondini A. L. P., Selivon D., et al. (2007). The gene transformer of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS One* 2.
- Ruiz M. F., Stefani R. N., Mascarenhas R. O., Perondini A. L. P., Selivon D. and Sánchez L. (2005). The gene doublesex of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics* 171: 849–854.
- Ruiz M. F. and Sánchez L. (2010). Effect of the gene transformer of *Anastrepha* on the somatic sexual development of *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* 54: 627–633.
- Rull J., Abraham S., Kovaleski A., Segura D. F., Islam A., Wornoyaporn V., et al. (2012). Random mating and reproductive compatibility among Argentinean and southern Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Bull. Entomol. Res.* 102: 435–443.
- Rull J., Abraham S., Kovaleski A., Segura D. F., Mendoza M., Liendo M. C., et al. (2013). Evolution of pre-zygotic and post-zygotic barriers to gene flow among three cryptic species within the *Anastrepha fraterculus* complex. *Entomol. Exp. Appl.* 148: 213–222.
- Saastamoinen M., Bocedi G., Cote J., Legrand D., Guillaume F., Wheat C. W., et al. (2018). Genetics of dispersal. *Biol. Rev.* 93: 574–599.
- Saccone G., Salvemini M., Pane A. and Polito C. (2008). Masculinization of XX *Drosophila* transgenic flies expressing the *Ceratitidis capitata* DoublesexM isoform. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 1043–1050.

- Sahara K., Marec F., Eickhoff U. and Traut W. (2003). Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome* 46: 339–342.
- Sahara K., Marec F. and Traut W. (1999). TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosom. Res.* 7: 449–460.
- Salgueiro J., Pimper L. E., Segura D. F., Milla F. H., Russo R. M., Asimakis E., et al. (2020). Gut Bacteriome Analysis of *Anastrepha fraterculus* sp. 1 During the Early Steps of Laboratory Colonization. *Front. Microbiol.* 11: 1–17.
- Salles L. A. (1995). Bioecologia e Controle da Mosca das Frutas Sul-Americana. EMBRAPA- CFACT, Pelotas, R. S., Brazil, 58 pp.
- Salvemini M., Robertson M., Aronson B., Atkinson P., Polito L. C. and Saccone G. (2009). *Ceratitidis capitata* transformer-2 gene is required to establish and maintain the autoregulation of Cctra, the master gene for female sex determination. *Int. J. Dev. Biol.* 53: 109–120.
- Sambrook J. and Russell D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez L. (2008). Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 837–856.
- Sangpakdee W., Tanomtong A., Fan X., Pinthong K., Weise A. and Liehr, T. (2016). Application of multicolor banding combined with heterochromatic and locus-specific probes identify evolutionary conserved breakpoints in *Hylobates pileatus*. *Mol. Cytogenet.* 9: 1–6.
- Santaguida S. and Musacchio A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* 28: 2511–2531.
- Savelkoul P., Aarts H., Dijkshoorn L., Duim B., Rademaker W., Schouls L., et al. (1999). Analysis: the State of an Art Amplified-Fragment Length Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3083.
- Scannapieco A. C., Conte C. A., Rivarola M., Wulff J., Muntaabski I., Ribone A., et al. (2020). Transcriptome analysis of *Anastrepha fraterculus* sp. 1 males, females, and embryos: Insights into development, courtship, and reproduction. *BMC Genetics* 21(Suppl 2):136.
- Schmid M. (1980). Chromosome banding in amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83–103.
- Schmid M. and Guttenbach M. (1988). Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosom.* 1988 972 97, 101–114.
- Schutze M. K., Virgilio M., Norrbom A. and Clarke A. R. (2017). Tephritid Integrative Taxonomy: Where We Are Now, with a Focus on the Resolution of Three Tropical Fruit Fly Species Complexes. *Annu. Rev. Entomol.* 62: 147–164.
- Schweizer D. and Ambros P. F. (1994). Chromosome Banding, Methods in Molecular Biology: Chromosome Analysis Protocols, in *Chromosome Analysis Protocols*, ed. J. Gosden (New York: Humana Press Inc.), 97–112.
- Segura D. F., Petit Marty N., Sciarano R., Vera M. T., Calcagno G., Allinghi A., et al. (2007). Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 90(1): 154–162.
- Segura D. F., Vera M. T., Cagnotti C. L., Vaccaro N., De Coll O., Ovruski S. M., et al. (2006). Relative abundance of *Ceratitidis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in diverse host species and localities of Argentina. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 70–83.
- Segura D. F., Vera M. T., Rull J., Wornoayporn V., Islam A. and Robinson A. S. (2011). Assortative mating among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) hybrids as a possible route to radiation of the fraterculus cryptic species complex. *Biol. J. Linn. Soc.* 102: 346–354.
- Selivon D., Morgante J. S. and Perondini A. L. P. (1997). Egg size, yolk mass extrusion and hatching behavior in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae). *Brazilian J. Genet.* 20: 1–9.
- Selivon D. and Perondini A. L. P. (1997). Evaluation of techniques for C and ASG banding of the mitotic chromosomes of *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). *Brazilian J. Genet.* 20: 651–653.
- Selivon D. and Perondini A. L. P. (2007). Especies crípticas del complejo *Anastrepha fraterculus* en Brasil. in *Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo.*, ed. S. y G. Editores (DF, México), 101–118.
- Selivon D., Perondini A. L. P., Hernández-Ortiz V. and Prezotto L. F. (2022). Genetical, Morphological, Behavioral, and Ecological Traits Support the Existence of Three Brazilian Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex of Cryptic Species. *Front. Ecol. Evol.* 10: 1–22.
- Selivon D., Perondini A. L. P. and Morgante J. S. (1999). Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Genet. Mol. Biol.* 22.
- Selivon D., Perondini A. L. P. and Morgante J. S. (2005a). A genetic-morphological characterization of

- two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98: 367–381.
- Selivon D., Perondini A. L. P. and Rocha L. S. (2005b). Karyotype characterization of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Neotrop. Entomol.* 2: 273–279.
- Selivon D., Sipula F. M., Rocha L. S., Luiz A. and Perondini P. (2007). Karyotype relationships among *Anastrepha bistrigata*, *A. striata* and *A. serpentina* (Diptera, Tephritidae). *Genet. Mol. Biol.* 30: 1082–1088.
- Sember A., Bertollo L. A. C. C., Ráb P., Yano C. F., Hatanaka T., de Oliveira E. A., et al. (2018). Sex Chromosome Evolution and Genomic Divergence in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Front. Genet.* 9: 71.
- Sember A., Pappová M., Forman M., Nguyen P., Marec F., Dalíková M., et al. (2020). Patterns of sex chromosome differentiation in spiders: Insights from comparative genomic hybridisation. *Genes (Basel)*. 11: 1–28.
- Sharakhov I. V., Mavragani-Tsipidou P., Zacharopoulou A., Drosopoulou E., Augustinos A., Bourtzis K., et al. (2014). Protocols for cytogenetic mapping of arthropod genomes. 1st Edition. Ed, I. V. Sharakhov.
- Shearman D. C. A. and Frommer M. (1998). The *Bactrocera tryoni* homologue of the *Drosophila melanogaster* sex-determination gene doublesex. *Insect Mol. Biol.* 7: 355–366.
- Shen C. H. (2019). The Genome. *Diagnostic Mol. Biol.*, 117–141.
- Šichová J., Voleníková A., Dincă V., Nguyen P., Vila R., Sahara K., et al. (2015). Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in Leptidea wood white butterflies Speciation and evolutionary genetics. *BMC Evol. Biol.* 15: 1–16.
- Siljak-Yakovlev S., Pustahija F., Šolić E. M., Bogunić F., Muratović E., Bašić N., et al. (2010). Towards a genome size and chromosome number database of balkan flora: C-values in 343 taxa with novel values for 242. *Adv. Sci. Lett.* 3: 190–213.
- sinavimo (2021). <https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/anastrepha-frate>.
- Singh B. N. (2016). The genus *Drosophila* is characterized by a large number of sibling species showing evolutionary significance. *J. Genet.* 95: 1053–1064.
- Smith-Caldas M., McPherson B. A., Silva J. G. and Zucchi R. A. (2001). Phylogenetic relationships among species of the fraterculus group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase 1. *Neotrop. Entomol.* 30: 565–573.
- Souza I. L., Galián J., De la Rúa P., Bertollo L. A. C. and Moreira-Filho O. (2001). Non-random distribution of the GC-rich heterochromatin and nucleolar rDNA sites on *Astyanax scabripinnis* chromosomes. *Cytologia (Tokyo)*. 66: 85–91.
- Staden R., Judge D. P. and Bonfield J. K. (2003). Managing Sequencing Projects in the GAP4 Environment. Introduction to Bioinformatics. A Theoretical and Practical Approach. Eds. S. A. Krawetz and D. Womble Totawa: Human Press Inc.
- Steck G. J. (1991). Biochemical systematics and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 84: 10–21.
- Steck G. J. (1999). Taxonomic status of *Anastrepha fraterculus*. The South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus* (Wied.) in *Advances in artificial rearing, taxonomic status and biological studies* (Vienna).
- Steck G. J. and Sheppard W. S. (1993). Mitochondrial DNA variation in *Anastrepha fraterculus*. in *Fruit Flies, Biology and Management*, eds. M. Aluja and P. Liedo (New York: Springer-Verlag), 9–14.
- Stegnii V. (1993). Genome Architectonics, Systemic Mutations, and Evolution. Novosibirsk Univ.
- Steinberg E. R., Nieves M., Fantini L. and Mudry M. D. (2014). Primates karyological diagnosis and management programs applications. *J. Med. Primatol.* 43: 455–467.
- Stevens N. M. (1905). Studies in Spermatogenesis With Especial Reference to the "Accessory Chromosome". Ed. E. P. Encyclopedia Arizona State University. School of Life Sciences. Center for Biology and Society. Embryo Project Encyclopedia.
- Stone A. (1942). The fruit flies of the genus *Anastrepha*. *Misc. Publ.* 439, 112.
- Stormo B. M. and Fox D. T. (2017). Polyteny: still a giant player in chromosome research. *Chromosome Res.* 25, 201.
- Sugayama R., Kovaleski A., Liedo P. and Malavasi A. (1998). Colonization of a new fruit crop by *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in Brazil: a demographic analysis. *Environ. Entomol.* 27: 642–648.
- Sumner A. (1990). Chromosome banding. Ed. Unwin Hyman London: Unwin Hyman Ltd. London.
- Sumner A., Evans H. and Buckland R. (1971). New Technique for Distinguishing between Human

- Chromosomes. *Nature* 232: 31–32.
- Sumner A. T. (2003). Chromosomes Organization and Functions. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Sumner A. T. (2008). Chromosomes: Organization and Function. Ed. John Wiley & Sons.
- Sutton B. D., Steck G. J., Norrbom A. L., Rodriguez E. J., Srivastava P., Alvarado N. N., et al. (2015). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) variation in the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex (Diptera, tephritidae) of the Andean region. *Zookeys* 540: 175–191.
- Suzuki H. and Sakurai S. (1992). Compensatory changes in silver-stainability of nucleolar organizer regions in mice. *Japanese J. Genet.* 67: 217–232.
- Tanaka T. U., Clayton L. and Natsume T. (2013). Three wise centromere functions: See no error, hear no break, speak no delay. *EMBO Rep.* 14: 1073–1083.
- Tanksley S. D., Young N. D., Paterson A. H. and Bonierbale M. W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Bio/Technology* 7: 257–264.
- Team R. C. (2018). R: A language and environment for statistical computing. <https://www.r-project.org/>.
- Telenius H., Carter N., Bebb C., Nordenskjold M., Ponder B. and Tunnacliffe, A. (1992). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718–725.
- Thalhammer S., Langer S., Speicher M. R., Heckl W. M. and Geigl, J. B. (2004). Generation of chromosome painting probes from single chromosomes by laser microdissection and linker-adaptor PCR. *Chromosom. Res.* 12: 337–343.
- Toder R., Xia Y. and Bausch E. (1998). Interspecies comparative genome hybridization and interspecies representational difference analysis reveal gross DNA differences between humans and great apes. *Chromosome Res.* 6: 487–494.
- Tram U. and Sullivan W. (2002). Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Science* 296: 1124–1126.
- Traut W. (1999). The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths. *Eur. J. Entomol.* 96: 227–235.
- Traut W., Eickhoff U. and Schorch J. C. (2001). Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Cell Sci.* 23: 155–161.
- Traut W., Sahara K., Otto T. D. and Marec F. (1999). Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173–180.
- Travis J. M. J., Delgado M., Bocedi G., Baguette M., Bartoń K., Bonte D., et al. (2013). Dispersal and species' responses to climate change. *Oikos* 122: 1532–1540.
- Tremethick D. J. (2007). Higher-Order Structures of Chromatin: The Elusive 30 nm Fiber. *Cell* 128: 651–654.
- Tsurusaki N., Nakano S. and Katakura H. (1993). Karyotypic Differentiation in the Phytophagous Ladybird Beetles *Epilachna vigintioctomaculata* Complex and Its Possible Relevance to the Reproductive Isolation, with a Note on Supernumerary Y Chromosomes Found in *E. pustulosa*. *Zoolog. Sci.* 10: 997–1015.
- van Doorn G. S. (2014). Patterns and Mechanisms of Evolutionary Transitions between Genetic Sex-Determining Systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Vaničková L., Břízová R., Mendonça A. L., Pompeiano A. and Do Nascimento R. R. (2015a). Intraspecific variation of cuticular hydrocarbon profiles in the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) species complex. *J. Appl. Entomol.* 139: 679–689.
- Vaničková L., Hernández-Ortiz V., Bravo I. S. J., Dias V., Roriz A. K. P., Laumann R. A., et al. (2015b). Current knowledge of the species complex *Anastrepha fraterculus* (Diptera, tephritidae) in Brazil. *Zookeys* 540: 211–237.
- Vera M. T., Cáceres C., Wornoyaporn V., Islam A., Robinson A. S., de La Vega M. H., et al. (2006). Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99: 387–397.
- Vicoso B. and Bachtrog D. (2015). Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera. *PLoS Biol* 13: 1–23.
- Vigoder F. M., Araripe L. O. and Carvalho A. B. (2021). Identification of the sex chromosome system in a sand fly species, *Lutzomyia longipalpis* s.l. *G3*, 2021, Vol. 11, No. 8.
- Vilardi J. C., Freilij D., Ferreyra L. I. and Gómez-Cendra P. (2021). Ecological phylogeography and coalescent models suggest a linear population expansion of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in southern South America. *Biol. J. Linn. Soc.* 133: 779–795.
- Vítková M., Fuková I., Kubíčková S. and Marec F. (2007). Molecular divergence of the W chromosomes in

- pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosom. Res.* 15: 917–930.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–14.
- Vuylsteke M., Peleman J. D. and van Eijk M. J. T. (2007). AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nat. Protoc.* 2: 1387–1398.
- Wachtler F., Hopman A. H. N., Wiegant J. and Schwarzacher H. G. (1986). On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* 167: 227–240.
- Wang Y. Z., Li B. Y., Hoffmann A. A., Cao L. J., Gong Y. J., Song W., et al. (2017). Patterns of genetic variation among geographic and host-plant associated populations of the peach fruit moth *Carposina sasakii* (Lepidoptera: Carposinidae). *BMC Evol. Biol.* 17: 1–12.
- Wappner P. (1995). Mecanismos moleculares involucrados en la esclerotización de la cutícula de los insectos. PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires.
- White M. J. D. (1940). The origin and evolution of multiple sex chromosome mechanisms. *J Genet* 40: 303–336.
- White M. J. D. (1973). *Animal Cytology and Evolution*. 3rd. edition. Cambridge University, Cambridge.
- Whitten M. J. (1971). Insect control by genetic manipulation of natural populations. *Science* 171: 682–684.
- Willhoefft U. and Franz G. (1996). Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144: 737–745.
- Wilson E. B. (1906). Studies on chromosomes. III. The sexual differences of the chromosome groups in Hemiptera, with some considerations on the determination and inheritance of sex. *J. Exp. Zool.* 3: 1–40.
- Wright A. E., Dean R., Zimmer F. and Mank J. E. (2016). How to make a sex chromosome. *Nat. Commun.* 7: 1–8.
- Wu J. and Qin M. (2019). “Linkage Mapping in Pear,” in *Compendium of Plant Genomes*, 103–112.
- Wuelker W., Dévai G. and Dévai I. (1989). Computer Assisted Studies of Chromosome Evolution in the Genus *Chironomus* (Dipt.). Comparative and Integrated Analysis of Chromosome Arms A, E and F. *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung* 2, 373–387.
- Xu S. S., Liu Z., Zhang Q., Niu Z., Jan C. C. and Cai X. (2016). Chromosome painting by GISH and multicolor FISH. *Methods Mol. Biol.* 1429: 7–21.
- Yano C. F., Bertollo L. A. C., Ezaz T., Trifonov V., Sember A., Liehr T., et al. (2017). Highly conserved Z and molecularly diverged W chromosomes in the fish genus *Tripottheus* (Characiformes, Tripottheidae). *Heredity (Edinb)*. 118, 276.
- Yano C. F., Bertollo L. A. C., Liehr T., Troy W. P. and Cioffi M. D. B. (2016). W Chromosome Dynamics in *Tripottheus* Species (Characiformes, Tripottheidae): An Ongoing Process Narrated by Repetitive Sequences. *J. Hered.* 107, 342.
- Yu H.-T., Ma G. C., Lee D. J., Chin S. C., Chen T. L., Tsao H. S., et al. (2012). Use of a cytogenetic whole-genome comparison to resolve phylogenetic relationships among three species: implications for mammalian systematics and conservation biology. *Theriogenology* 77: 1615–1623.
- Zacharopoulou A. (1987). Cytogenetic analysis of mitotic and salivary gland chromosomes in the med *Ceratitis capitata*. *Genome* 29: 67–71.
- Zacharopoulou A. (1990). Polytene chromosome maps in the medfly *Ceratitis capitata*. *Genome* 33: 184–197.
- Zacharopoulou A., Augustinos A. A., Drosopoulou E., Tsoumani K. T., Gariou-Papalexioy A., Franz G., et al. (2017). A review of more than 30 years of cytogenetic studies of Tephritidae in support of sterile insect technique and global trade. *Entomol. Exp. Appl.* 164: 204–225.
- Zacharopoulou A., Augustinos A. A., Sayed W., Robinson A. S. and Franz G. (2011a). Mitotic and polytene chromosome analysis of the oriental fruit, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 139: 79–90.
- Zacharopoulou A. and Franz G. (2013). Genetic and Cytogenetic Characterization of Genetic Sexing Strains of *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 106: 995–1003.
- Zacharopoulou A., Sayed W., Augustinos A. A., Yesmin F., Robinson A. S. and Franz G. (2011b). Analysis of mitotic and polytene chromosomes and photographic polytene chromosome maps in *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 104: 306–318.
- Zambetaki A., Zacharopoulou A., Scouras Z. G. and Mavragani-tsipidou P. (1999). The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by in situ hybridization to the

- salivary gland polytene chromosomes. *Genome* 751: 744–751.
- Zapater M. and Robinson A. S. (1986). Sex chromosome aneuploidy in a male-linked translocation in *Ceratitis capitata*. *Can. J. Genet. Cytol.* 28, 161–167.
- Zepeda-Cisneros C. S., Salvador J., Hernández M., García-Martínez V., Ibañez-palacios J., Zacharopoulou, A., et al. (2014). Development, genetic and cytogenetic analyses of genetic sexing strains of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). *BMC Genet.* 15: S1.
- Zhao J. T., Frommer M., Sved J. A. and Zacharopoulou A. (1998). Mitotic and polytene analyses in the Queensland fruit, *Bactrocera tryoni* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 41: 510–526.
- Zhimulev I. F., Belyaeva E. S., Semeshin V. F., Koryakov D. E., Demakov S. A., Demakova O. V., et al. (2004). Polytene Chromosomes: 70 Years of Genetic Research. *Int. Rev. Cytol.* 241: 203–275.
- Zhimulev I. F., Semeshin V. F. and Belyaeva E. S. (1981). Fine cytogenetical analysis of the band 10a1-2 and the adjoining regions in the *Drosophila melanogaster* X chromosome. *Chromosoma* 82: 9–23.
- Zhou A., Tian P., Li Z., Li X., Tan X., Zhang Z., et al. (2020). Genetic diversity and differentiation of populations of *Chlorops oryzae* (Diptera, Chloropidae). *BMC Ecol.* 20: 1–14.
- Zhou Q., Zhang G., Zhang Y., Xu S., Zhao R., Zhan Z., et al. (2008). On the origin of new genes in *Drosophila*. *Genome Res.* 18: 1446–1455.
- Zhou R. N. and Hu Z. M. (2007). The Development of Chromosome Microdissection and Microcloning Technique and its Applications in Genomic Research. *Curr. Genomics* 8: 67–72.
- Zrzavá M., Hladová I., Dalíková M., Šíchová J., Ůunap E., Kubíčková S., et al. (2018). Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener *A. sylvata*. *Genes (Basel)*. 9.
- Zucchi R. A. (2000). Taxonomia. in *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*, eds. A. Malavasi and R. A. Zucchi (Holos), 327.
- Zucchi R. A. (2007). "Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* em Brasil," in *Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): diversidad, biología y manejo*, ed. V. Hernandez-Ortiz (DF: S y G), 77–100.
- Zucchi R. A. (2019). Fruit flies in Brazil— *Anastrepha* species and their host plants and parasitoids. www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/. Accessed: 28 Nov 2019.
- Zuckerandl E. and Hennig W. (1995). Tracking heterochromatin. *Chromosoma* 104: 75–83.
- Zygouridis N. E., Argov Y., Nemny-Lavy E., Augustinos A. A., Nestel D. and Mathiopoulos K. D. (2014). Genetic changes during laboratory domestication of an olive fly SIT strain. *J. Appl. Entomol.* 138: 423–432.