

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



**EL GEN “TRANSFORMER-2” DE “ANASTREPHA”
(DIPTERA, TEPHRITIDAE).**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Francesca Sarno

Bajo la dirección de los doctores

Lucas Sánchez Rodríguez
María Fernanda Ruiz Lorenzo

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-9254-6

© Francesca Sarno, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Genética



**El gen *transformer-2* de *Anastrepha*
(Diptera, Tephritidae)**

Tesis Doctoral presentada por

FRANCESCA SARNO

Madrid, 2010

D. Lucas Sánchez Rodríguez, Profesor de Investigación del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C) y D^a María Fernanda Ruiz Lorenzo, Investigadora contratada del Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C),

CERTIFICAN

Que Dña. FRANCESCA SARNO, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Federico II de Nápoles, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral, con el título: El gen *transformer-2* de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). Dicho trabajo reúne los requisitos para su presentación.

Madrid, de de 2010

El Director de la Tesis

La Co-directora de la Tesis

Prof. Lucas Sánchez Rodríguez

Dra. María Fernanda Ruiz Lorenzo

El trabajo de esta tesis doctoral se enmarca dentro del estudio de la evolución de los mecanismos de determinación sexual en insectos, utilizando *Anastrepha* como modelo experimental. El objetivo de la presente tesis doctoral es el aislamiento y caracterización del ortólogo del gen *transformer-2* (*tra-2*) en once especies de tefrítidos pertenecientes al género *Anastrepha*. La idea es determinar si dicho gen participa en la determinación sexual de estos tefrítidos, y a qué nivel ejercería su función. Otro objetivo es estudiar la evolución molecular del mismo. Se ha elegido *Anastrepha obliqua* como especie de referencia. El gen *transformer-2* de *Anastrepha obliqua* (*Aotra-2*) está formado por ocho exones y siete intrones, y se transcribe durante todo el desarrollo y la vida adulta de ambos sexos. También se ha demostrado la expresión de este gen en los ovarios de hembras adultas. El gen *transformer-2* codifica una proteína putativa de 249 aminoácidos, la cual posee las características de las proteínas de la familia SR: un dominio RRM de unión al ARN flanqueado por dos dominios SR ricos en dipéptidos arginina-serina. La inyección del dsARN de *transformer-2* de *Anastrepha obliqua* en huevos de la especie *Anastrepha* aff. *fraterculus* sp. 1 determina que embriones XX se desarrollen como pseudomachos, como consecuencia de la eliminación de la función de *tra2* endógena. La proteína Tra2 participa en la determinación sexual de *Anastrepha*, siendo esta requerida para el procesamiento tipo hembra de los transcritos primarios de los genes *transformer* y *doublesex*. El gen *transformer-2* parece no poseer la función de autorregulación negativa que presenta su ortólogo en *Drosophila*. Se ha aislado y caracterizado el marco abierto de lectura del gen *transformer-2* de otras diez especies pertenecientes al género *Anastrepha*. La comparación de las proteínas Tra2 de todas las especies de *Anastrepha* entre sí y con las proteínas Tra2 de otros insectos ha puesto de manifiesto que el mayor grado de conservación lo presentan el dominio RRM de unión al ARN y en la región "linker" que une este último dominio al dominio RS2 en el extremo carboxilo terminal de la proteína, mientras que los dominios RS1 y RS2 muestran mayor variabilidad aminoacídica.

<u>I. Abreviaturas</u>	3
<u>II. Introducción</u>	6
1. Mecanismos de determinación sexual en Insectos	7
2. Determinación sexual en <i>Drosophila melanogaster</i>	8
3. El gen <i>transformer-2</i> de <i>Drosophila melanogaster</i>	11
4. El genero <i>Anastrepha</i> (Diptera, Tephritidae)	14
<u>III. Objetivo</u>	20
<u>IV. Materiales y métodos</u>	22
1. MATERIALES	23
1.1 Productos	23
1.2 Medios de cultivo y soluciones	23
1.3 Mantenimiento de <i>Anastrepha</i>	23
2. MÉTODOS	24
2.1 Análisis moleculares.	24
2.1.1 Extracción de ADN genómico	24
2.1.2 Extracción de ADN plasmídico	24
2.1.3 Diseño de los oligonucleótidos.	25
2.1.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Polimerase Chain Reaction)	25
2.1.5 Electroforesis en gel de agarosa	27
2.1.6 Clonaje de productos de PCR	27
2.1.7 Comprobación de colonias positivas por PCR	27
2.1.8 Extracción de ARN total	27
2.1.9 Extracción de ARN poliadenilado	28
2.1.10 Retrotranscripción (RT)	28
2.1.11 Secuenciación de ADN	28
2.1.12 Análisis de las secuencias	28
2.1.13 Análisis de los posibles sitios de procesamiento	28
2.1.14 Análisis del posible sitio de inicio de la transcripción	28
2.2 Aislamiento y caracterización del gen <i>transformer-2</i> de <i>Anastrepha obliqua</i>	29
2.2.1 RT-PCR con oligonucleótidos degenerados	29
La reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 5µg de ARN total de hembras	29
2.2.2 RACE (“Rapid Amplification of cDNA Ends”)	29
2.2.3 Genome Walker (Paseo Cromosómico)	30
2.2.4 Expresión del gen <i>transformer-2</i> de <i>Anastrepha obliqua</i> durante el desarrollo mediante RT-PCR	30
2.2.5 “Southern blot”	31
3. Estudio funcional del gen <i>transformer-2</i> de <i>Anastrepha</i>	32
3.1 RNA de interferencia	32
3.1.1 Microinyección de ARN de doble cadena	32
3.1.2 Preparaciones cromosómicas	32
3.1.3 Análisis de la expresión de los genes <i>transformer</i> y <i>doublesex</i> de <i>Anastrepha</i> aff. <i>fraterculus</i> sp. 1	33
<u>V. Resultados</u>	34
1. Aislamiento, organización molecular y transcritos del gen <i>transformer-2</i> de <i>Anastrepha obliqua</i>	35
2. Comparación de la organización molecular del gen <i>transformer-2</i> de <i>Anastrepha obliqua</i> con el gen <i>transformer-2</i> de otros insectos	37
3. Expresión del gen <i>transformer-2</i> de <i>Anastrepha obliqua</i>	39

4. La proteína Transformer2 de <i>Anastrepha</i> y de otros insectos	42
5. El gen <i>transformer-2</i> se necesita para la determinación sexual en <i>Anastrepha</i>	52
<u>VI. Discusión</u>	58
1. Función de la proteína Transformer2 en la determinación sexual de <i>Anastrepha</i>	60
2. Diferencias en la regulación del gen <i>transformer-2</i> , entre <i>Drosophila</i> y <i>Anastrepha</i>	63
3. Evolución molecular de la proteína Transformer2	65
<u>VII. Conclusiones</u>	67
<u>VIII. Bibliografía</u>	69
<u>IX. Anexos</u>	79

I. Abreviaturas

µg: microgramo

µl: microlitro

µM: micromolar

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

Aotra: *transformer* de *Anastrepha obliqua*

Aotra-2: *transformer-2* de *Anastrepha obliqua*

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

°C: grados centígrados

E: embriones

FS: soma de hembra (female soma)

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

dsRNA: ARN de doble cadena (double strand RNA)

dsx: *doublesex*

DsxRE: elemento repetido de *doublesex* (*doublesex repeat element*)

EDTA: ácido etilendiamintetraacético

fru: *fruitless*

g: gramo

Gal: galactosidasa

IPTG: isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido

Her: *hermaphrodite*

ix: *intersex*

Kb: kilobases

l: litro

L: larvas

LB: medio de Luria-Bertani

M: molar

mg: miligramo

MgCl₂: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mM: milimolar

MS: soma de macho (male soma)

MW: marcador de peso molecular (molecular weight)

ng: nanogramo

O: ovarios

ORF: marco abierto de lectura (*open reading frame*)

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

poli-A: ácido poliadenílico

poli-U: ácido poliuracílico

R: residuo aminoacídico de arginina

RACE: amplificación rápida de los extremos de ADNc (*rapid amplification cDNA ends*)

RNAi: ARN de interferencia (RNA interference)

RRM: dominio de unión a ARN (RNA recognition motif)

RS: dominio rico en residuos aminoacídicos de arginina y serina

RT: retrotranscripción

S: residuo aminoacídico de serina

SDS: dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*)

Sxl: *Sex-lethal*

TBE: tampón tris bórico EDTA

TE: tampón tris EDTA

Tris: Tris(hidroximetil)amino-metano

tra: *transformer*

tra-2: *transformer-2*

U: unidad

UTR: región no traducida (*untranslated region*)

II. Introducción

La reproducción sexual es la regla general dentro del Reino Animal para la perpetuación de las especies.

Cuando se habla de desarrollo sexual, se hace referencia a la integración de dos procesos distintos: determinación del sexo y diferenciación sexual. En el Reino Animal, la determinación del sexo tiene lugar gracias a un conjunto de mecanismos que hacen que un embrión siga el programa de desarrollo que va a dar lugar a un macho o a una hembra. La diferenciación sexual se refiere a la expresión sexo-específica de genes, la cual lleva a la formación de las estructuras características de macho o hembra. El resultado de la simbiosis de estos dos procesos es el dimorfismo sexual (revisado en Sánchez *et al.*, 2005).

La finalidad última del trabajo desarrollado por nuestro grupo de investigación es el conocimiento de la evolución de los mecanismos de determinación sexual. Esto sólo es posible una vez que se conozcan y comparen las bases genéticas de la determinación sexual en distintas especies.

Los mecanismos básicos de determinación sexual se pueden catalogar según la señal primaria responsable de la discriminación del sexo. Podemos distinguir tres señales fundamentales: la constitución cromosómica, el efecto materno y las condiciones ambientales. Debido al hecho de que todas estas señales se dan en los Insectos, dicha clase del Reino Animal constituye un modelo experimental apropiado para los estudios que nos proponemos desarrollar.

1. Mecanismos de determinación sexual en Insectos

Como hemos mencionado anteriormente, la determinación sexual puede basarse en la constitución cromosómica del cigoto (Bull, 1983). Este caso implica una discriminación a nivel del número y/o tipo de cromosoma, entre los distintos sexos. En general, uno de los sexos suele ser homomórfico (XX) y el otro heteromórfico (XY).

En el caso de *Drosophila melanogaster* (la mosca del vinagre), el sexo se determina según la razón entre el número de cromosomas sexuales (X) y el número de juegos haploides autosómicos (A). Una razón cromosómica igual a uno determina el sexo femenino y una razón inferior a uno el masculino.

En otros insectos el sexo heteromórfico es capaz de codificar un factor determinante. El caso más representativos se encuentra en la mosca mediterránea de las frutas *Ceratitis capitata*, donde los machos (XY) llevan el factor determinante, denominado también factor masculinizante, localizado en el cromosoma Y. El caso de *Musca domestica* (la mosca común) destaca respecto al anterior porque el factor

masculinizante se puede localizar en cualquier cromosoma, sexual o autosoma (Dübendorfer *et al.*, 2002). El sistema contrario: hembra heteromórfica y macho homomórfico, lo encontramos en los lepidópteros (macho ZZ y hembra ZW).

Un ejemplo de determinación sexual basada en el número de cromosomas es el de *Apis mellifera* (la abeja), donde las hembras son haploides y los machos diploides. En el caso de este insecto, el sexo del cigoto depende de un sólo locus formado por varios alelos denominado *Complementary Sex Determination (cds)*. Para ser fértiles los machos tienen que ser hemicigóticos para este locus (Beye *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, la discriminación entre los dos sexos puede depender de otros factores diferentes de la constitución cromosómica. Uno de ellos es el llamado efecto materno. En este caso, el sexo del individuo depende, exclusivamente, del sexo de la madre, como ocurre en *Chrysomya rufifacies* (la mosca azul o mostarda). En esta especie, existen dos tipos de hembras: ginogénicas (F/f) y androgénicas (f/f). Las primeras sólo producen descendencia femenina gracias a la expresión de un factor materno determinante F que, depositado en el oocito, le impone este tipo de desarrollo al cigoto. Las hembras androgénicas son homocigóticas para el alelo recesivo f , el cual no codificaría un factor F funcional. Estas hembras, por lo tanto, producen oocitos sin factor materno, los cuales darían lugar a descendencia únicamente masculina.

Finalmente, podemos mencionar los factores ambientales, sobretodo la temperatura, factor capaz de influenciar la determinación sexual en insectos, como ocurre en algunas especies del díptero *Sciara*.

2. Determinación sexual en *Drosophila melanogaster*

Como especie de referencia para llevar a cabo los estudios comparativos entre insectos que ocupan distintas posiciones evolutivas se utiliza *D. melanogaster*, ya que la base genética de la determinación sexual de este insecto está muy bien caracterizada.

La señal primaria que determina el sexo es la señal X/A (razón entre el número de cromosomas X y el número de juegos haploides de autosomas). En individuos $2X;2A$ esta señal X/A tiene un valor de 1, lo que determina el desarrollo de hembra, mientras que en individuos $1X;2A$ la señal X/A tiene un valor de 0.5, lo que determina el desarrollo de macho (Cline, 1993). Recientemente, se ha propuesto que es el número de cromosomas X y la relación X/A la señal primaria que determina el sexo (Erickson y Quintero, 2007).

La determinación sexual en *D. melanogaster* está bajo el control del gen *Sex-lethal* (*Sxl*). Las relaciones epistáticas entre *Sxl* y los otros genes de la determinación sexual, tales como *transformer* (*tra*), *transformer-2* (*tra-2*) y *doublesex* (*dsx*), han puesto de manifiesto que existe una relación jerarquizada entre ellos, la cual es responsable de la formación de una cascada genética. La regulación ocurre a nivel del procesamiento del transcrito primario: el producto de un gen controla el procesamiento específico de sexo del transcrito primario del gen que se encuentra por debajo en la cascada (revisado en Sánchez *et al.*, 2005).

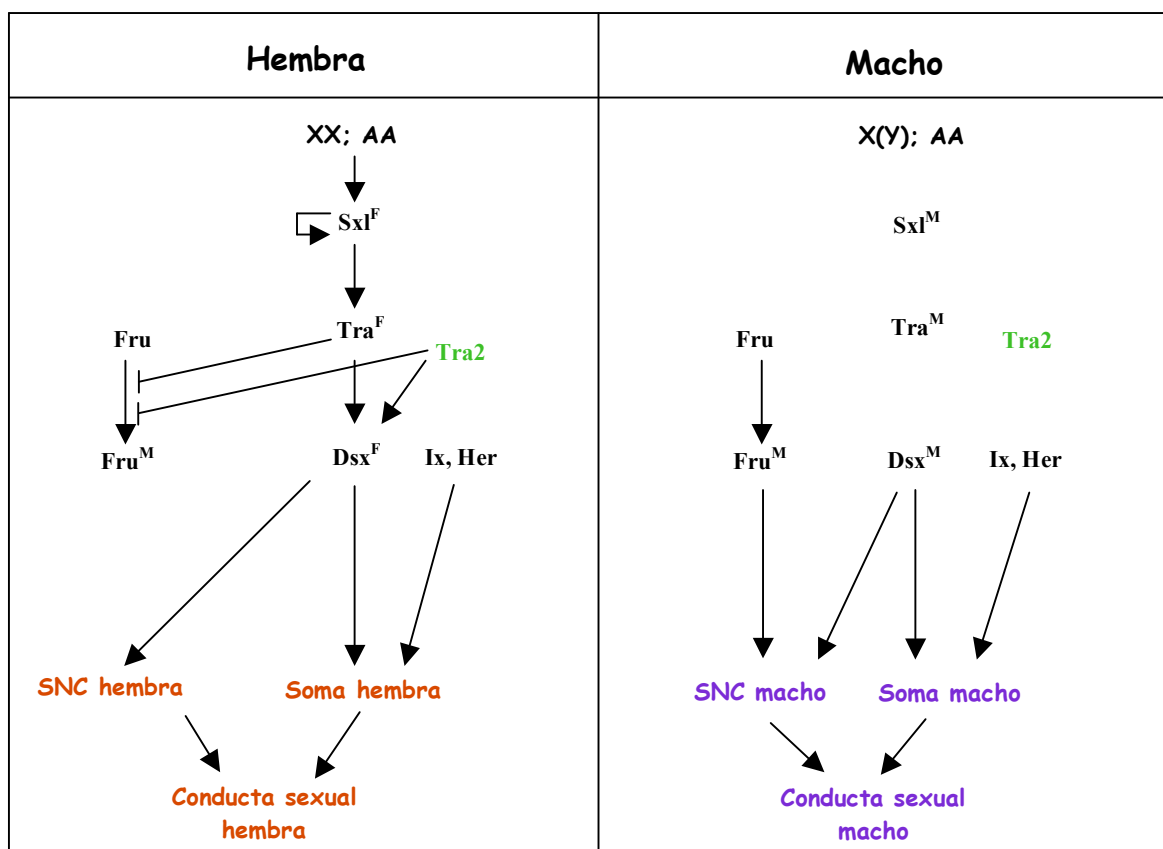


Figura 1. Cascada genética de la determinación sexual en *D. melanogaster*. Sxl^F y Sxl^M corresponden, respectivamente, a la forma funcional y no funcional de la proteína Sex-lethal. Tra^F y Tra^M corresponden a las isoformas proteicas funcional y no funcional codificadas por el gen *tra*. Dsx^F y Dsx^M son isoformas funcionales, específicas de hembra y macho, respectivamente. Fru^M corresponde a la proteína funcional, específica de macho. En los machos, en ausencia de señal X/A, el procesamiento que tiene lugar por defecto lleva a la formación de las proteínas Sxl^M, Tra^M, Dsx^M y Fru^M. Las proteínas Tra2, Ix y Her se producen en los dos sexos. SNC hace referencia al sistema nervioso central (Sánchez, 2008).

El gen *Sxl* se encuentra al principio de la cascada (Figura 1). La proteína Sxl participa en el procesamiento alternativo de su propio transcrito primario, dando lugar a la formación de una proteína funcional en las hembras y no funcional en los machos. La

proteína Sxl también regula el procesamiento del transcrito primario del gen *tra*, el siguiente gen en la cascada, de manera que en las hembras se produce una proteína Tra funcional.

En los machos, en ausencia de proteína Sxl funcional, el transcrito primario de *tra* sigue la ruta de procesamiento tipo macho, dando lugar a una proteína truncada, no funcional (Boggs *et al.*, 1987).

El gen *dsx* es el último gen de la jerarquía genética que controla la determinación sexual. El procesamiento de este gen resulta ser diferencial en macho y en hembra (procesamiento alternativo). Por ello, sus mensajeros se traducen dando lugar a proteínas distintas según el género del insecto. Responsable de este procesamiento alternativo es la proteína Tra que, en las hembras, forma un complejo con el producto del gen constitutivo *tra-2*. Este complejo, uniéndose a unas secuencias específicas, localizadas en el exón 3, hace que se active un sitio 3' alternativo de procesamiento. De este modo, se retiene el intrón 3, específico de hembra, y se produce un ARNm *dsx^F*, el cual codifica la proteína *Dsx^F* que determina el desarrollo de hembra (Figura 2A). En los machos, donde no existe proteína Tra funcional, el transcrito primario de *dsx* sigue el procesamiento alternativo que da lugar al ARNm *dsx^M*, el cual codifica la proteína *Dsx^M* que determina el desarrollo de macho (Burtis y Baker, 1989; Hoshijima *et al.*, 1991). El papel de *Dsx*, junto con los factores proteicos Intersex (Ix) y Hermaphrodite (Her), es controlar el dimorfismo sexual somático de los organismos.

El complejo Tra-Tra2 controla también el procesamiento del transcrito primario del gen *fruitless (fru)*, producido a partir de su promotor P1, el cual está involucrado en el control del dimorfismo sexual del sistema nervioso central (Hall, 1994). En hembras, el complejo Tra-Tra2 se une a unas secuencias de unión específicas (identificadas con tres puntos negros en la figura 2B). Esta unión hace que se active un sitio alternativo, más débil, del procesamiento y, como consecuencia, el exón específico de hembra (en rojo en la figura 2B) es incorporado al ARNm. Este exón contiene codones de parada de la traducción, produciéndose una proteína *Fru^F* truncada, no funcional. En machos, donde no existe proteína Tra, el exón específico de hembra no se incorpora en el mensajero y se produce proteína *Fru^M* funcional (Ryner *et al.*, 1996; Heinrichs *et al.*, 1998).

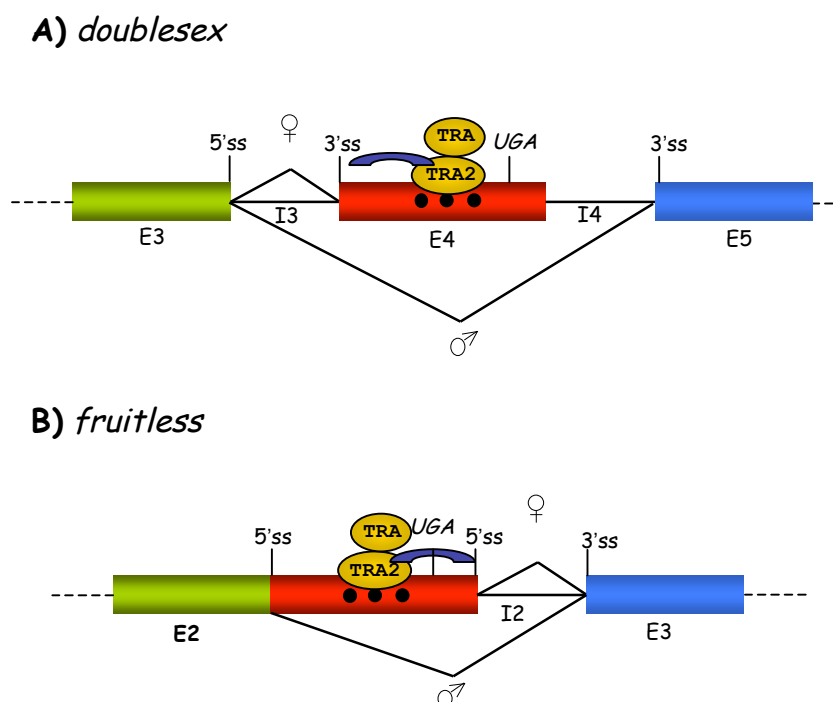


Figura 2. Esquemas del procesamiento alternativo específico de sexo de los transcritos primarios de los genes *dsx* (A) y *fru* (B) de *D. melanogaster*. Los rectángulos coloreados representan los exones. En verde el exón común a ambos sexos, en rojo el exón específico de hembra y en azul el exón específico de macho. Las líneas negras indican el procesamiento alternativo específico de hembra o de macho. Los puntos negros indican los sitios de unión del complejo Tra-Tra2. Se indican los codones de parada de la traducción y los sitios 5'ss y 3'ss del procesamiento.

3. El gen *transformer-2* de *Drosophila melanogaster*

El gen *tra-2* de *D. melanogaster* está formado por siete exones y seis intrones (Figura 3A). Éste es un gen constitutivo que se expresa de forma ubicua a lo largo del desarrollo del individuo, en ambos sexos. El gen *tra-2* de *D. melanogaster*, gracias a un mecanismo de procesamiento alternativo, puede codificar cuatro transcritos alternativos (Figura 3B), los cuales producirán sólo tres distintos tipos de polipéptido (Figura 3C). De ellos, uno es específico de la línea somática, otro de la línea germinal, mientras que el tercero se expresa en ambas.

En la línea somática, no se aprecian diferencias en la expresión de *tra2* en machos y hembras, ni en los varios estadios del desarrollo (Goralski *et al.*, 1989; Mattox and Baker, 1991). Dos transcritos se expresan en el soma. Uno contiene seis exones (el exón 3 se elimina, por procesamiento alternativo) y el sitio de inicio de la traducción

se localiza en el exón 2 (Figura 3A). Este transcrito codifica una proteína de 264 aminoácidos (Tra2-264 en la Figura 3C). El otro transcrito contiene los siete exones: el exón 3 no se procesa. Este transcrito codifica una proteína diferente de la anterior ya que, no eliminándose el exón 3, se forma un sitio de inicio de la traducción más fuerte que el anterior, localizado entre los exones 3 y 4 (Figura 3A). Esta proteína está formada por 226 aminoácidos (Figura 3C).

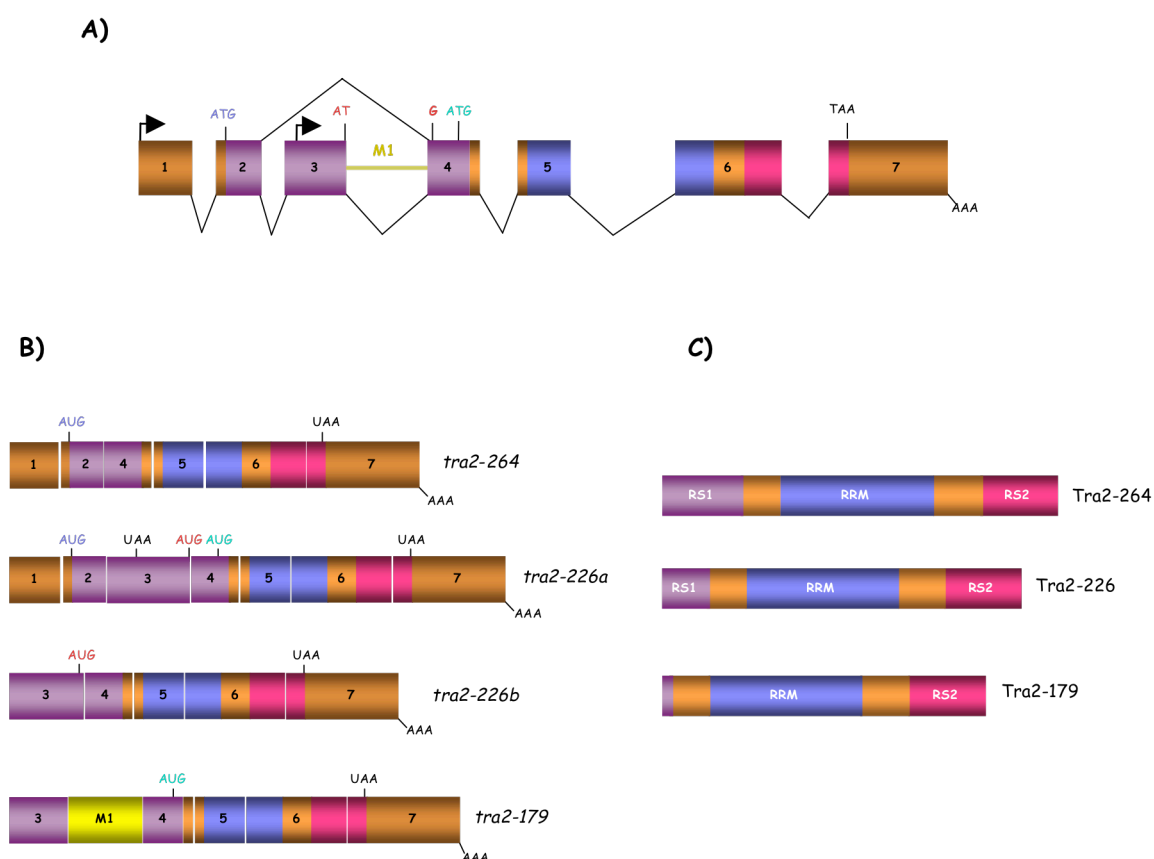


Figura 3. Estructura y patrón de expresión del gen *tra-2* de *D. melanogaster*. Los rectángulos coloreados representan los exones. En morado y rosa se representan los exones codificantes los dominios RS1 y RS2, respectivamente; en azul se representan los exones que codifican el dominio RRM. Los rectángulos naranjas corresponden a regiones exónicas que no codifican ningún dominio en particular y a las regiones 5' y 3' UTR. Las líneas negras representan el procesamiento. La línea amarilla se corresponde con el intrón M1 que se retiene en la línea germinal. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (flechas), los sitios de inicio (ATG) y de parada (TAA) de la traducción, y el sitio de poliadenilación (AAA). **(A)** Organización molecular del gen. **(B)** Los cuatro mensajeros obtenidos por procesamiento alternativo del transcrito primario. **(C)** Los tres distintos polipéptidos Tra-226, Tra-264 y Tra-179.

Como en la línea somática, también en las células reproductivas masculinas se expresan varios transcritos, más exactamente, dos (Figura 4). Para producirlos, la maquinaria de transcripción utiliza un sitio de inicio diferente del que se usa en la línea

somática. Esto hace que estos dos transcritos presenten sólo cinco de los siete exones: del número 3 al número 7. La diferencia entre estos dos transcritos reside en el hecho de que uno retiene el intrón M1, mientras el otro se somete a procesamiento completo (Figura 4). Esto ocurre porque el sitio 3' de procesamiento del intrón no tiene una eficiencia del 100% a causa de una secuencia consenso que se aleja de las habituales; esto hace que la eficiencia del procesamiento sea solo de un 60-70% respecto al normal (Amrein *et al.*, 1990; Mattox *et al.*, 1990). Así, mientras el primer transcrito utilizará el codón de inicio de la traducción más fuerte que se encuentra posicionado entre los exones 3 y 4, el segundo usará el que se localiza aguas abajo que pertenece al exón 4. El primer transcrito codificará una proteína funcional de 226 aminoácidos, mientras el segundo dará lugar a una proteína de 179 aminoácidos, truncada y, por ello, no funcional (Figura 4).

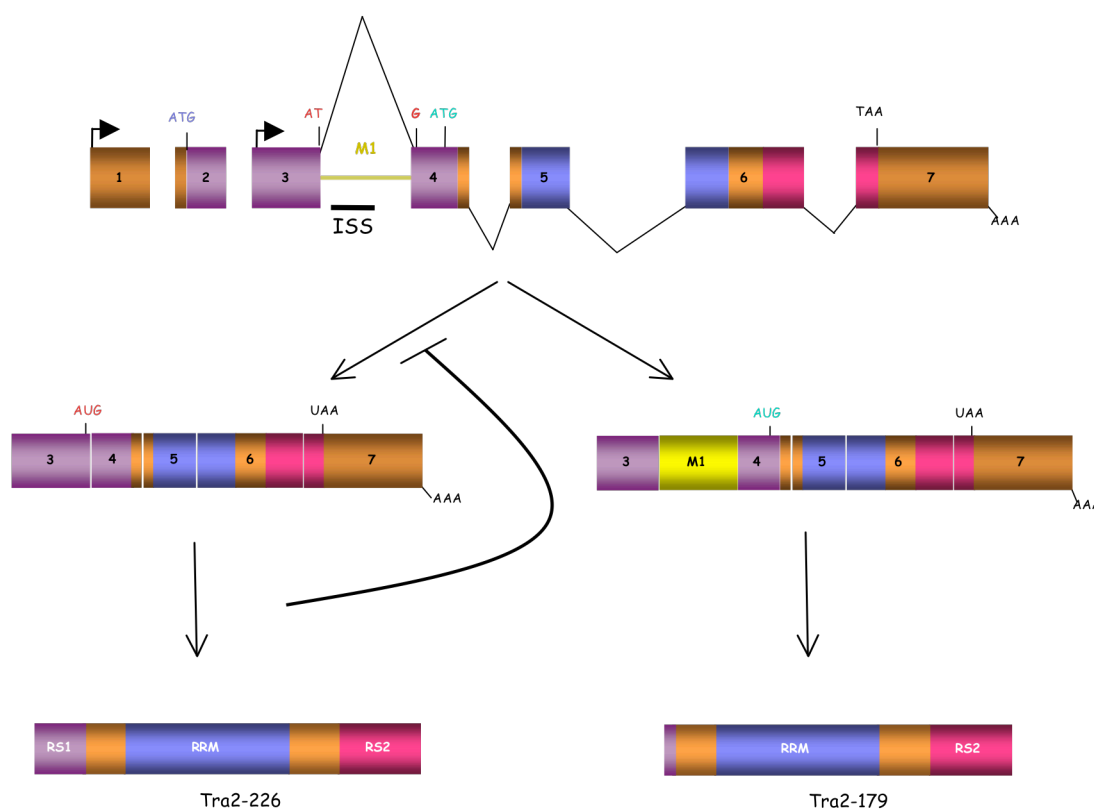


Figura 4. Regulación del procesamiento del transcrito primario del gen *tra-2* en la línea germinal masculina de *D. melanogaster*. Los rectángulos coloreados representan los exones. La línea y el rectángulo amarillo representan el intrón M1, el cual se retiene en la línea germinal. Se indican los codones de inicio y parada de la traducción, los sitios de poliadenilación (AAA) y los dominios RS1, RS2 y RRM. Las líneas de color negro representan el procesamiento alternativo. Las flecha negra señalan los sitios de inicio de la transcripción. Se indica la localización de los sitios de unión de la proteína Tra2 (ISS).

Las proteínas Tra2 pertenecen a la familia de proteínas RS (Sephard y Hertel, 2009). Estos son polipéptidos ricos en residuos de arginina y serina y trabajan como

reguladores del procesamiento del ARN. Como se puede observar en las Figura 3 y 4, estas proteínas poseen dos dominios RS, implicados en la interacción proteína-proteína, y un dominio RRM de unión a RNA.

El gen *tra-2* de *D. melanogaster*, a pesar de expresarse en línea germinal tanto en macho como en hembra, en la primera desempeña un papel de autorregulación que difiere del papel jugado en el soma (Watanabe, 1975; Belote and Baker, 1983). La expresión de *tra-2* en *D. melanogaster* resulta esencial para la fertilidad masculina. En ausencia de Tra2-226, tendría lugar una espermatogénesis normal, pero con baja movilidad de los espermatozoides. Esto se debe a la participación de Tra2 en el procesamiento de al menos dos genes implicados en la espermatogénesis: *exuperantia* (Hazzelrigg y Tu, 1994) y *alternative testis transcript* (Madigan *et al.*, 1996). El papel de estos dos genes no resulta claro todavía, pero se ha visto que mutaciones en uno de ellos lleva a la formación de espermátidas no funcionales. La expresión excesiva del gen *tra-2* también afectaría a la espermatogénesis. Normalmente, las isoformas funcional y no funcional guardan un determinado equilibrio. Cuando éste se desplaza hacia la formación de proteína funcional, interviene un mecanismo de autorregulación: Tra2-226 (funcional) actúa en el procesamiento de su transcrito primario llevando a un aumento de producción de Tra2-179 (no funcional) (Figura 4), con lo cual se restablece el equilibrio (McGuffin *et al.*, 1998).

4. El género *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae)

Las moscas de las frutas pertenecientes a la familia Tephritidae presentan una distribución universal. Entre ellas hay muchas que eligen como huésped frutos considerados importantes para la agricultura. A consecuencia de ello, estos insectos presentan un gran impacto en la economía mundial.

C. capitata, *B. oleae* y *A. obliqua* son algunos ejemplos de las especies pertenecientes a los tefrítidos (White y Elson-Harris, 1992; Aluja, 1994). La primera especie se encuentra en todos los continentes, mientras que la segunda se encuentra principalmente en las regiones mediterráneas. La última especie es endémica de América.

La elección del huésped suele ser bastante estricta. En la pulpa del huésped, la hembra depone sus huevos, lo que permitirá el desarrollo de su progenie para asegurar la subsistencia de la especie. A pesar de estas preferencias, las especies pertenecientes al género *Anastrepha* saben adaptarse y, en ausencia de su huésped favorito, pueden utilizar una gran variedad de frutos para sus fines reproductivos.

Al género *Anastrepha* pertenecen alrededor de 200 especies distintas (Zucchi, in Malavasi, A., Zucchi, R.A. *et al.*, 2000). *A. obliqua* (Figura 5A) es una de las especies más estudiadas ya que provoca grandes problemas en la agricultura. Este insecto fue catalogado por primera vez en 1933 (Sein, 1933), gracias a una campaña de erradicación con insecticidas que se llevó a cabo debido a una grave plaga de insectos que tuvo lugar en Florida en 1930. Esta campaña duró desde 1930 hasta 1936 y provocó una destrucción masiva de insectos, pero, al mismo tiempo, fue causa del descubrimiento de varias especies, entre ellas, *A. obliqua*. En realidad, la primera vez que se describió un insecto con las características peculiares de *A. obliqua* fue en 1930 y éste se catalogó como *unnamed species* (especie sin nombre). Fue Sein, en el 1933, quién la clasificó como *A. fraterculus* var. *mombinpraeoptans* (Berg, 1979; Weems, 1970).

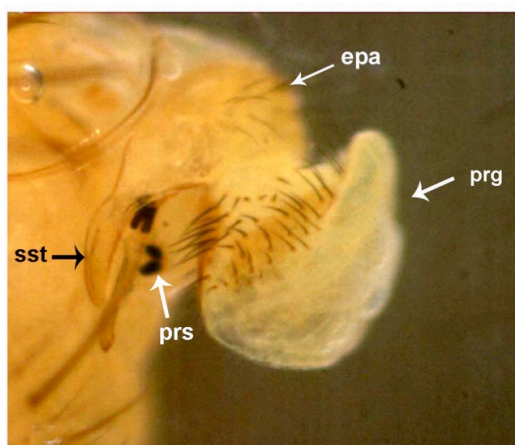
Como se ha mencionado anteriormente, existen alrededor de 200 especies pertenecientes al género *Anastrepha*. Para el desarrollo del trabajo descrito en esta tesis se eligieron once de ellas pertenecientes a diferentes grupos. Además de *A. obliqua*, se analizaron cuatro especies del complejo *fraterculus* (Norrobom *et al.*, 1999): *A. aff. fraterculus* sp. 1., *A. aff. fraterculus* sp. 2, *A. aff. fraterculus* sp. 3, *A. aff. fraterculus* sp. 4 (Selivon *et al.*, 2004; Selivon *et al.*, 2005a); tres especies que pertenecen al grupo *serpentina* (Norrobom, 2002): *A. serpentina*, *A. striata* y *A. bistrigata* y las especies *A. grandis*, *A. sororcula* y *A. amita* (Selivon *et al.*, 2005b) (Tabla 1). Morfológicamente estas especies se distinguen por pequeños detalles tales como el diseño de las alas, los colores de la parte dorsal del tórax o el tamaño y la forma del ovopositor en las hembras. También puede haber pequeñas variaciones en el tamaño del cuerpo en las distintas especies. Todos estos insectos han sido identificados y cedidos por la profesora D. Selivon, Departamento de Genética e Biología Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brasil.

En todas estas especies, es posible distinguir los machos de las hembras, exclusivamente por las diferencias morfológicas de sus terminalia (Figuras 5 B y C).

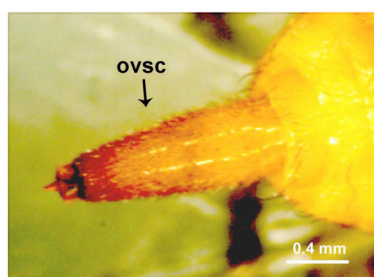
A)



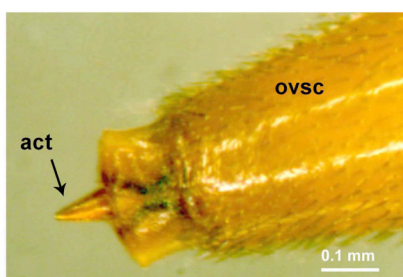
B)



C)



D)



E)

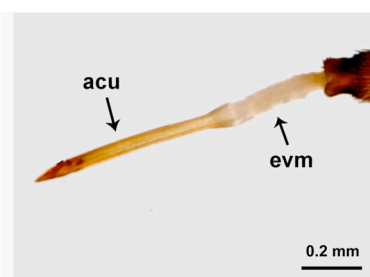


Figura 5. *Anastrepha obliqua*. (A) Hembra de la especie *Anastrepha obliqua* poniendo huevos en un huésped a través del su ovopositor. (B) Terminalia de un macho: sst=surstylus; prs=prensisetae; epa=epandrium; prg=protiger (C-E) Terminalia de una hembra: ovsc=oviscape; act=aculeus tip; acu=aculeus; evm=eversible membrane.

4 La determinación sexual en *Anastrepha*

Anastrepha es un género perteneciente a la familia Tephritidae de los dípteros, al igual que *Ceratitis* y *Bactrocera*. El estudio de la determinación sexual de los tefrítidos se inició en *C. capitata*. En este insecto los individuos XX son hembras y los individuos XY son machos. Se han aislado los ortólogos de los genes *Sxl* (Saccone *et al.*, 1998), *tra* (Pane *et al.*, 2002), *tra-2* (Salvemini *et al.*, 2009) y *dsx* (Saccone *et al.*, 2008) en *C. capitata*.

El gen *Sxl* de *C. capitata* no parece jugar, en la determinación sexual, el mismo papel clave que su ortólogo en los drosófilidos, pues la proteína *Sxl* está presente en ambos sexos (Saccone *et al.*, 1998).

El gen *tra-2* de *C. capitata* juega un papel regulador clave, actuando como la memoria celular para la determinación sexual mediante un mecanismo de autorregulación positiva. Según este mecanismo, la propia proteína *Tra* regula el procesamiento específico de hembra de su propio transcrito primario (Pane *et al.*, 2002). De este modo, sólo en las hembras se produce proteína *Tra* funcional, mientras que en los machos se produce proteína *Tra* truncada no funcional. Además, el gen *tra* de *C. capitata* (Pane *et al.*, 2005) provee parcialmente la función *tra* en moscas de *D. melanogaster* mutantes para este gen.

El gen *tra-2* de *C. capitata* se transcribe en ambos sexos, durante todo el desarrollo y la vida adulta, expresándose, además, en los ovarios de las hembras adultas. Su transcrito primario produce un único ARNm, el cual codifica la proteína *Tra2* presente en ambos sexos. Dicha proteína es necesaria para la formación del complejo proteico *Tra-Tra2*, responsable de la autorregulación positiva del gen *tra* (Salvemini *et al.*, 2009). El transcrito primario de *tra* contiene secuencias de unión del complejo *Tra-Tra2* (Pane *et al.*, 2002). La unión de este complejo a esas secuencias causa la eliminación de los exones específicos de macho, dando lugar al ARNm que codifica la proteína *Tra* funcional (Salvemini *et al.*, 2009).

El gen *dsx* de *C. capitata* se transcribe en ambos sexos durante el desarrollo y la vida adulta del individuo. Su transcrito primario se procesa de una forma alternativa en cada sexo. En las hembras, el complejo *Tra* y *Tra2* interacciona con secuencias presentes en el exón específico de hembra. Esta interacción hace que el exón específico quede incorporado en el ARNm, el cual codificará la proteína *Dsx^F* de hembra. En los machos, el complejo *Tra-Tra2* no se forma por la ausencia de *Tra*, lo que determina que el pre-ARNm de *dsx* siga un procesamiento alternativo, donde se elimina el exón específico de hembra y se incorpora el exón específico de macho. Se

producirá un ARNm que codificará la proteína Dsx^M , específica de macho (Saccone *et al.*, 2008; Salvemini *et al.*, 2009).

Estos resultados confirmarían la propuesta de Pane *et al.* (2002) sobre el papel ejercido por *tra* en la determinación sexual de *Ceratitis*: este gen desempeñaría en los tefrítidos el papel desempeñado por *Sxl* en los drosofilidos. Según la hipótesis de Pane *et al.* (2002), *tra* sería el responsable de la memoria celular para la determinación sexual en esta especie.

En *Ceratitis*, la cascada de determinación sexual seguiría este esquema: la expresión materna de los genes *tra* (Pane *et al.*, 2002) y *tra-2* (Salvemini *et al.*, 2009) proveería el cigoto de proteínas maternas Tra y Tra2 con lo cual se formaría el complejo Tra-Tra2. En las hembras, dicho complejo actuaría sobre el procesamiento del transcrito primario resultante de la expresión cigótica inicial de *tra*, determinando la eliminación los exones específicos de macho. Se produciría, así, la primera proteína Tra cigótica funcional, estableciéndose de este modo la autorregulación positiva de *tra*. En los machos XY, el factor M de masculinidad presente en el cromosoma Y impediría el establecimiento de la autorregulación positiva de *tra*, con lo cual se establecería el desarrollo de macho del embrión (Figura 6).

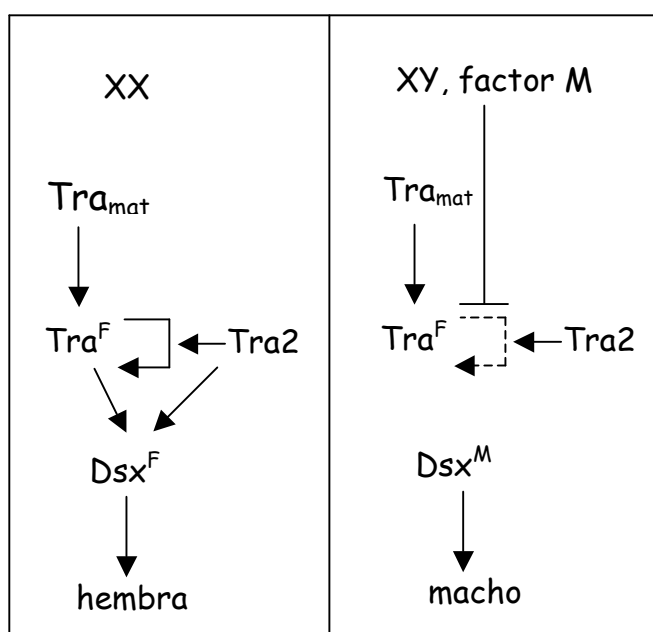


Figura 6. La cascada genética de la determinación sexual en *Ceratitis*. Tra_{mat} y Tra^F se refieren, respectivamente, a la proteína Tra materna y cigótica. Dsx^F y Dsx^M corresponden a las proteínas Dsx de hembra y macho.

Los ortólogos de los genes de la determinación sexual se han estudiado también en los tefrítidos *B. oleae* y en doce especies de *Anastrepha*. Los genes *Sxl* (Lagos *et al.*, 2005), *tra* (Lagos *et al.*, 2007) y *dsx* (Lagos *et al.*, 2005) de *B. oleae* y los genes *tra* (Ruiz *et al.*, 2007a) y *dsx* (Ruiz *et al.*, 2005; 2007) de *Anastrepha* muestran las mismas características que sus homólogos de *Ceratitis*. En los casos de *Bactrocera* y *Anastrepha* no se ha demostrado que el cromosoma Y de los machos sea el portador del factor de masculinidad. No obstante, dada la similitud de función de los genes de la determinación sexual estudiados en *Ceratitis*, *Bactrocera* y *Anastrepha*, es muy probable que también en estos dos últimos tefrítidos, la regulación de la determinación sexual siga el mismo mecanismo que en *Ceratitis*.

III. Objetivo

El trabajo se enmarca dentro del estudio de la evolución de los mecanismos de determinación sexual en insectos, utilizando *Anastrepha* como modelo experimental. A este respecto, uno de los propósitos es buscar en *Anastrepha* los genes homólogos de los que forman la cascada de la determinación sexual en *Drosophila*. Otro propósito es evidenciar cuánto se ha modificado dicha cascada entre las especies más ancestrales de los insectos y el linaje evolutivo más reciente de los drosofilidos.

El objetivo de la presente tesis doctoral es el aislamiento y caracterización del ortólogo del gen *tra-2* en once especies de tefrítidos pertenecientes al género *Anastrepha*. La idea es averiguar si dicho gen participa en la determinación sexual de estos tefrítidos y a qué nivel ejerce su función, así como estudiar su evolución molecular.

IV. Materiales y métodos

1. MATERIALES

1.1 Productos

Se han utilizado productos procedentes de las marcas comerciales: Amersham Biosciences, Amersham Pharmacia Biotech, Bio Rad, Biotecx, Clontech, Invitrogen, Kodak, Merck, Perkin Elmer, Promega, Pronadisa, Qbiogen, Quiagen, Roche, GE Healthcare y Sigma.

1.2 Medios de cultivo y soluciones

La composición de los medios de cultivo y soluciones utilizadas en esta tesis se encuentran descritos en Maniatis *et al.* (1982).

1.3 Mantenimiento de *Anastrepha*

Las especies de *Anastrepha* estudiadas en esta tesis fueron recolectadas por el grupo de la Prof. D. Selivon, del Instituto de Biociências de la Universidad de São Paulo, Brasil (Tabla 1). Los insectos se mantuvieron en cajas de metacrilato y metal, en una cámara a temperatura constante de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa entre el 60 y el 80%. El rango de luminosidad se mantuvo entre 4000 y 5000 lx, con un fotoperiodo de 12:12h. Cada especie de insecto creció en el fruto más apropiado para la recolección de las respectivas larvas (Tabla 1).

Especie	Fruto huésped	Origen
A. aff. fraterculus sp. 1	Guayaba (<i>Psidium guayaba</i>)	Salesópolis (SP) 23°31'S, 45°49'W
A. aff. fraterculus sp. 2	Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Florianópolis (SP) 27°48'S, 48°33'W
A. aff. fraterculus sp. 3	Guayaba (<i>Psidium guayaba</i>)	Salesópolis (SP) 23°31'S, 45°49'W
A. aff. fraterculus sp. 4	Guayaba (<i>Psidium guayaba</i>)	Guayaquil (Ecuador) 02°12'S, 79°53'W
A. amita	"Pombeiro" (<i>Citharexylum myrianthum</i>)	São Paulo (SP) 23°33'S, 46°33'W
A. obliqua	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Indaiatuba (SP) 22°51'S, 46°58'W
A. sororcula	Almentdro tropical (<i>Terminalia catappa</i>)	Nova Soure (BA) 11°30'S, 38°50'W
A. striata	Guayaba (<i>Psidium guayaba</i>)	Hidrolândia (SP) 17°02'S, 49°13'W
A. serpentina	Albaricoque (<i>Manilkara zapotilla</i>)	São Sebastião (SP) 23°49'S, 45°25'W
A. grandis	Calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>)	Naranjal Paulista (SP) 23°05'S, 47°57'W
A. bistrigata	Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Indaiatuba (SP) 22°51'S, 46°58'W

Tabla 1. Especies pertenecientes al género *Anastrepha*. Se muestran las especies de *Anastrepha* utilizadas en este estudio, su lugar de recolección y los huéspedes donde se encontraron las larvas.

2. MÉTODOS

2.1 Análisis moleculares

2.1.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de moscas adultas de *Anastrepha* se llevó a cabo según se describe en Maniatis *et al.* (1982).

2.1.2 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de pequeñas cantidades de ADN plasmídico (5-7,5 µg) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el kit "High Pure Plasmid Isolation Kit" de la casa comercial Roche. La extracción de mayores cantidades de ADN plasmídico (50-100 µg) se efectuó utilizando el Kit "Plasmid Midi Kit" de la casa comercial Qiagen.

2.1.3 Diseño de los oligonucleótidos.

El diseño de los oligonucleótidos sintéticos utilizados como cebadores se realizó utilizando los programas en red: Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) y Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). La síntesis de todos los oligonucleótidos se llevó a cabo por la casa comercial Roche.

2.1.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Polimerase Chain Reaction)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en los termocicladores "GeneAmp PCR System 2400" (Perkin Elmer) y "GeneAmp PCR System 2700" (Applied Biosystems). Las concentraciones de los componentes, el volumen de la reacción, las parejas de cebadores y los programas empleados en las diferentes amplificaciones se especifican en el apartado correspondiente. La secuencia de los cebadores utilizados y su localización se especifican en la Tabla 2 y en la Figura 7, respectivamente.

CEBADOR	SECUENCIA
<i>Oligo dT</i>	5' T _{N30} 3'
<i>MAR 26</i>	5' MGI AGY CGN GGN TTY TGY TTY 3'
<i>MAR 17</i>	5' GTR TGI GSI CGY TKN GTD ATN GA 3'
<i>Tra2-B</i>	5' NCK RTC RTC DAT YTC CAT NCC 3'
<i>P1</i>	5' AGA GTT GGA ATG AGT CCA CG 3'
<i>P2</i>	5' CAC GTC GCT TAT CGT ATG GA 3'
<i>P3</i>	5' CAT ATT TTT AAT AGC GCG TAC G 3'
<i>P4</i>	5' ATT ACC AAG GTG TGG GCT TC 3'
<i>P5</i>	5' AGT GAA ATC CAG TTG ATA CGC 3'
<i>GW1</i>	5' TAT CAG GAT ATA GCC GAT GCT AAG GC 3'
<i>GW2</i>	5' CAA GCG TCT TTA GCT GCC TTA GCA TC 3'
<i>PM1</i>	5' TAC GAA CGC AGC TTA CTT CC 3'
<i>PM2</i>	5' CTT GCG GTT CTG AGA CTG AC 3'
<i>P1-T7</i>	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CTA GAG TTG GAA TGA GTC CAC G 3'
<i>P3-T7</i>	5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CTC ATA TTT TTA ATA GCG CGT ACG 3'
<i>AP1</i>	suministrado en el kit "el "BD Genome Walker™Universal Kit"
<i>AP2</i>	suministrado en el kit "el "BD Genome Walker™Universal Kit"

Tabla 2. Nombre y secuencia de los cebadores utilizados en este estudio. El cebador *MAR17* está descrito en Burghart *et al.*, (2005). Las secuencias de los cebadores *MAR26* y *Tra2B* han sido amablemente cedidas por la Dra. K. Komitopoulou. Para describir la secuencia de los oligonucleótidos degenerados se ha seguido el código de bases degeneradas IUB.

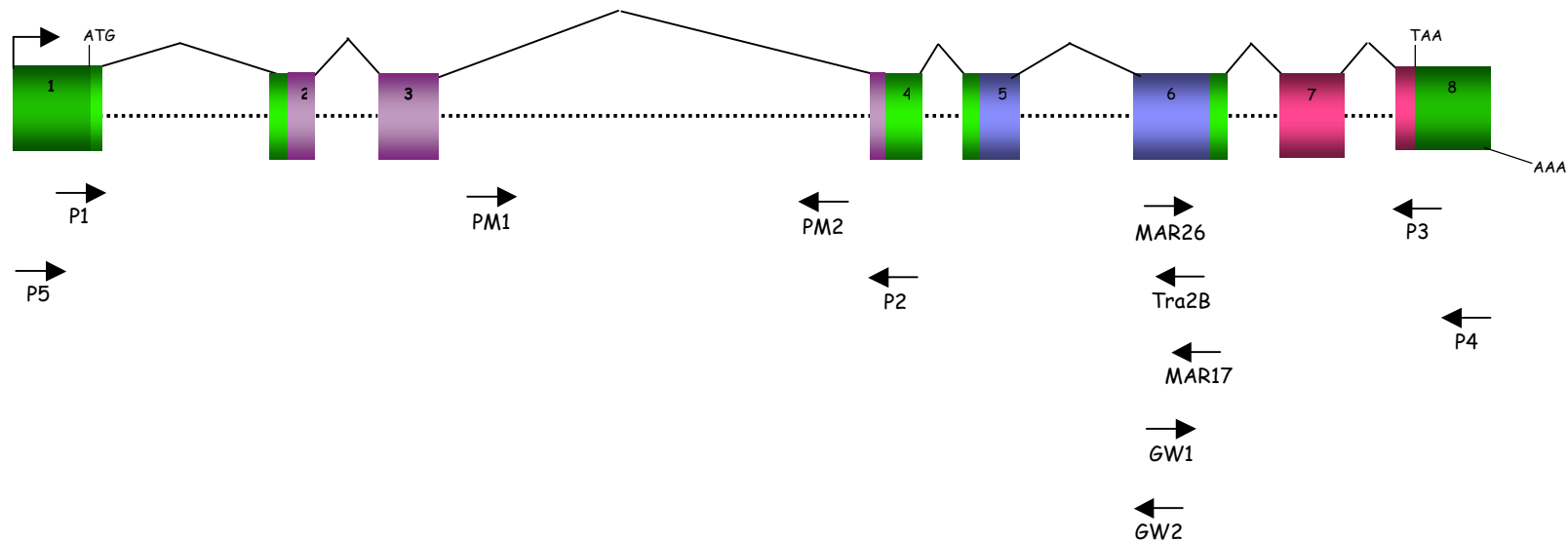


Figura 7. Organización molecular del gen *tra-2* de *A. obliqua* (*Aotra-2*) y cebadores utilizados en este estudio. Los rectángulos coloreados representan los exones. En morado y en rosa se representan, respectivamente, los dominios RS1 y RS2. En azul se representa el dominio RRM. En verde se han coloreado las regiones exónicas que no corresponden a ningún dominio particular y las regiones 3' y 5' UTR. Las líneas de puntos representan los intrones. Las líneas negras continuas representan el procesamiento del transcrito primario del gen. Se indican: el sitio de inicio de la transcripción (flecha), los sitios de inicio (ATG) y terminación (TAA) de la traducción y el sitio de poliadenilación (AAA). En la parte inferior de la figura se señala la localización de los cebadores utilizados en este estudio, cuyas secuencias se describen en la Tabla 2.

2.1.5 Electroforesis en gel de agarosa

El ADN genómico, el ADN plásmídico y los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa (Pronadisa) de concentraciones comprendidas entre el 0.8% y el 2%, en tampón TBE 1X (89mM Tris HCl, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA). Se siguió el protocolo descrito en Maniatis *et al.* (1982). Se utilizaron los marcadores de peso molecular comerciales "Molecular Weight Marker II y XIV" de Roche. Se incorporó a los geles Bromuro de etidio (Sharp *et al.*, 1973) y éstos se visualizaron en un sistema "GelDoc 2000", utilizando el programa "Quantity One" de Bio- Rad.

2.1.6 Clonaje de productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pCR 2.1-TOPO de Invitrogen o en el vector "pGEM-T Easy" de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos métodos permiten seleccionar las colonias con inserto a través del doble sistema Ampicilina/ β -galactosidasa descrito en Maniatis *et al.* (1982). La presencia del inserto en las colonias blancas se comprobó mediante PCR (siguiente apartado).

2.1.7 Comprobación de colonias positivas por PCR

Cada una de las colonias a analizar se resuspendió en 30 μ l de H₂O estéril. Previamente a la reacción de PCR, se calentaron 5 μ l de esta suspensión a 99°C, durante 5 minutos. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l utilizando las condiciones estándar (buffer 1x, 1,5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0,3 μ M de cada cebador y 2U de Taq polimerasa de Invitrogen o Roche). Se utilizaron los cebadores universales *M13 Forward* (-20) y *M13 Reverse* (-24) presentes en el vector o los cebadores específicos utilizados para amplificar el fragmento de interés. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 5 minutos a 95°C; 25 ciclos, cada uno compuesto por: 10 segundos a 94°C, una fase de 30 segundos a la temperatura de anillamiento de los cebadores utilizados y una última de elongación a 72°C, durante el tiempo estimado necesario para amplificar el fragmento de ADN; un ciclo de 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa (apartado 2.1.4) al 0,8% y se seleccionaron las colonias que podrían contener el fragmento de interés.

Los 25 μ l restantes de cada resuspensión, correspondientes a cada colonia seleccionada, se crecieron toda la noche a 37°C con agitación en 7ml de LB que contenía 50 μ g/ml de Ampicilina.

2.1.8 Extracción de ARN total

El ARN total de *Anastrepha* (embriones, larvas, ovarios, testículos, y adultos) se extrajo utilizando el reactivo "Trizol" (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.9 Extracción de ARN poliadenilado

El ARN mensajero de adultos de *A. obliqua* se purificó siguiendo el protocolo descrito en el kit "mRNA Purification Kit" de la casa comercial GE Healthcare.

2.1.10 Retrotranscripción (RT)

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a partir de ARN total o ARN poliadenilado, bien con cebadores específicos o con un *oligo* "d(T)" (Tabla 2) como se describe en el protocolo de la enzima " SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase" (Invitrogen). El cebador utilizado, el tipo de ARN y las cantidades de cada reacción se especifican en cada apartado. Antes de realizar la retrotranscripción se comprobó la ausencia de contaminación del ARN con ADN genómico, realizando una PCR sobre el mismo (control negativo del PCR).

2.1.11 Secuenciación de ADN

Todas las reacciones de secuenciación han sido realizadas por el Servicio de Secuenciación Automática de ADN del Centro de Investigaciones Biológicas (www.secugen.es).

2.1.12 Análisis de las secuencias

El análisis de todas las secuencias de ADN y proteínas se ha realizado utilizando los siguientes programas informáticos: DNA compare (Enterlist, Compare, Translate y Restrict) Editview y BioEdit y las siguientes bases de datos: NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), FlyBase (<http://flybase.org/>), FASTA (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.htm), CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw).

2.1.13 Análisis de los posibles sitios de procesamiento

Para analizar los posibles sitios de procesamiento de la secuencia de ADN genómico del gen *tra-2* de *Anastrepha* se utilizó el programa "Splice Site Prediction" (www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

2.1.14 Análisis del posible sitio de inicio de la transcripción

Para localizar los posibles sitios putativos de inicio de la transcripción del gen *tra-2* de *A. obliqua* se utilizó el programa "Neural Network Promoter Prediction" (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

2.2 Aislamiento y caracterización del gen *transformer-2* de *Anastrepha obliqua*

2.2.1 RT-PCR con oligonucleótidos degenerados

La reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 5µg de ARN total de hembras adultas de *A. obliqua*, utilizando un *oligo* "d(T)" como cebador. La reacción de amplificación (PCR) se llevó a cabo utilizando 1µl de ADNc en un volumen final de 25µl. Utilizando las siguientes condiciones Buffer 1x, 1.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada cebador y 2U de Taq polimerasa (Roche). Como cebadores se utilizaron dos oligonucleótidos sintéticos degenerados "MAR26" y "MAR17" (Tabla 2 y Figura 7) para la primera ronda de amplificación y "MAR26" y "TRA2B" (Tabla 2 y Figura 7) para la reamplificación todos ellos. Éstos cebadores se diseñaron a partir de regiones conservadas del dominio RRM de la proteína Tra2 de diversas especies (Figura 7). El programa de amplificación fue el siguiente: un primer ciclo de 2 minutos a 95°C; 45 ciclos, cada uno de ellos compuesto por: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 42°C y 10 segundos a 72°C; una elongación final de 7 minutos a 72°C.

Se reamplificó 1 µl del producto del PCR anterior utilizando las mismas condiciones anteriores con el siguiente programa de amplificación: un primer ciclo de 2 minutos a 95°C; 45 ciclos, cada uno de ellos compuesto por: 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 65°C y 10 segundos a 72°C; una elongación final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%, clonados en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) y secuenciados con los oligonucleótidos universales *M13 forward* (-20) y *M13 reverse* (-24).

2.2.2 RACE ("Rapid Amplification of cDNA Ends")

La caracterización de los extremos 5' y 3' de los ADNc de macho y hembra del gen *tra-2* de *A. obliqua* se llevó a cabo mediante la técnica RACE. Para la construcción de la genoteca se partió de 1µg de ARN poliadenilado de machos y hembras adultos (separadamente) de *A. obliqua*. La síntesis de la primera y segunda cadena de ADNc, la ligación de los adaptadores y las reacciones de PCR para la caracterización de los extremos 5' y 3' (reacciones 5'RACE y 3'RACE, respectivamente) se llevaron a cabo como se describe en el kit "Marathon™ cDNA Amplification" (Clontech). Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima " Advantage 2 PCR Enzyme System" (Clontech).

Tanto para el 5'RACE como para el 3'RACE se realizaron dos rondas de amplificación, utilizando como cebadores, en ambos casos, el oligonucleótido del adaptador "AP1" (en la primera PCR) o "AP2" (en la segunda PCR), suministrados en el kit, y un oligonucleótido específico diseñado a partir de la secuencia ya conocida del gen *tra-2*

de *A. obliqua*: "GW2" (para caracterizar el extremo 5') y "GW1" (para caracterizar el extremo 3') (Tabla 2 y Figura 7). Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima "Advantage 2 PCR Enzyme System" (Clontech). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, clonados en el vector pCR 2.1- Topo (Invitrogen) y secuenciados con los oligonucleótidos universales *M13 forward* (-20) y *M13 reverse* (-24).

2.2.3 Genome Walker (Paseo Cromosómico)

Para llevar a cabo el paseo cromosómico se empleó el kit "BD Genome Walker™ Universal kit" (Clontech). La síntesis de la genoteca genómica, la ligación de los adaptadores y las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo el protocolo proporcionado por el kit. Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima "Advantage 2 PCR Enzyme System" (Clontech).

Para cada reacción de amplificación se utilizó una pareja de cebadores formada por el oligonucleótido "AP1", suministrado por el kit, y un oligonucleótido específico, diseñado a partir de la secuencia del gen *tra-2* de *A. obliqua*. Los cebadores específicos que se utilizaron fueron: "GW2" y "GW1" (Tabla 2 y Figura 7).

Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en un geles de agarosa al 0,8%, clonados en el vector pCR 2.1-Topo (Invitrogen) y secuenciados con los oligonucleótidos universales *M13 forward* (-20) y *M13 reverse* (-24).

2.2.4 Expresión del gen *transformer-2* de *Anastrepha obliqua* durante el desarrollo mediante RT-PCR

Para analizar la expresión del gen *tra-2* de *A. obliqua* durante el desarrollo se hicieron dos experimentos distintos. En el primero, la retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 5µg de ARN total extraído de embriones, larvas, adultos de ambos sexos, testículos y ovarios de *A. obliqua*, utilizando el cebador "T30". Los cebadores que se utilizaron en la reacción de PCR fueron: "GW1" y "P4" (Tabla 2), localizados en los exones 6 y 7, respectivamente (Figura 7). Para la amplificación por PCR se utilizaron 2µl de ADNc en un volumen final de 50µl, con las siguientes condiciones: Buffer 1x, 1.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada cebador y 2U de Taq polimerasa (Invitrogen). Se utilizó el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C; 45 ciclos, cada uno de ellos compuesto por: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C; una elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, clonados en el vector pCR 2.1-Topo (Invitrogen) y secuenciados con los oligonucleótidos universales *M13 forward* (-20) y *M13 reverse* (-24).

En el segundo experimento la retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 2µg de ARN total extraído de soma de macho y hembras adultos, testículos y ovarios de *A. obliqua*, utilizando el cebador "T30". Para la amplificación por PCR se utilizó 1µl de este ADNc y la pareja de cebadores "P1" y "P2" (Tabla 2), diseñados sobre las secuencias de los exones 1 y 4, respectivamente (Figura 7). Se emplearon las siguientes condiciones: Buffer 1x, 1.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada cebador y 2U de Taq polimerasa (Invitrogen). El programa de amplificación fue: un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C; 50 ciclos, cada uno de ellos compuesto por: 10 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto segundos a 72°C; una elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, clonados en el vector pCR 2.1- Topo (Invitrogen) y secuenciados con los oligonucleótidos universales M13 (-20) y M13 reverse (-24).

2.2.5 "Southern blot"

El ADN, molde para el experimento de "Southern blot", procedía de experimentos de RT-PCR. La retrotranscripción se efectuó a partir de 2µg de ARN total extraído de tejido testicular de macho adulto de *A. obliqua*, utilizando el cebador "T30". Se llevaron a cabo dos reacciones distintas de PCR con el fin de amplificar diferentes fragmentos genómicos para el "Southern blot". Para cada reacción de PCR se usó, como molde, 1µl de ADNc en un volumen final de 50µl. Se emplearon las siguientes condiciones: Buffer 1x, 1.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada cebador y 2U de Taq polimerasa (Invitrogen). Las parejas de cebadores que se utilizaron en las reacciones fueron, respectivamente: "PM1" y "P2"; "P1" y "P2" (Tabla 2 y Figura 7). Se realizó el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de 5 minutos a 95°C; 45 ciclos cada uno de ellos compuesto por: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C; una elongación final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% y, posteriormente, se transfirieron a un filtro de nylon (Zeta-Probe Blotting Membranas, BIO RAD) por capilaridad, como se describe en Sambrook *et al.* (1989). El filtro se prehibridó a 65°C durante seis horas, en solución Church (4.24% Na₂HPO₄, 2.76% NaH₂PO₄H₂O, 7% SDS, 1mM EDTA, 1% BSA). La hibridación se llevó a cabo toda la noche a una temperatura de 65°C. Como sonda se utilizó un fragmento de 630 nucleótidos, obtenido por PCR sobre ADN genómico, usando la pareja de cebadores: "PM1" y "PM2" (Tabla 2 y Figura 7). La sonda se marcó con digoxigenina, usando el kit: "PCR DIG Labeling Mix kit" (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. El revelado se efectuó siguiendo el protocolo descrito en el kit: DIG Luminescent Detection kit for

Nucleic Acids (Roche). El filtro se expuso en películas de autorradiografía X-OMAT UV film (Kodak).

3. Estudio funcional del gen *transformer-2* de *Anastrepha*

3.1 RNA de interferencia

3.1.1 Microinyección de ARN de doble cadena

El ARN de doble cadena (*Aotra2*-dsRNA) se preparó según el protocolo descrito en Kennerdell y Carthew (1998). Se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando como molde la secuencia de lectura abierta completa del gen *tra-2* de *A. obliqua*, clonada en el plásmido pUAST. Para ello se utilizaron los cebadores "P1T7" y "P3T7" (Tabla 2), los cuales llevan secuencias del promotor T7 en sus extremos 5'. El fragmento amplificado de esta PCR fue utilizado como molde en una reacción de transcripción *in vitro*, usando la retrotranscriptasa T7 y siguiendo el protocolo descrito en el kit Megascript de Ambion. Este ARN de doble cadena se precipitó en etanol y posteriormente se resuspendió en el tampón de inyección descrito en Rubin y Spradling (1982), dejándolo a una concentración final de 8µM.

Para la recolección de embriones de *A. aff. fraterculus* sp. 1, se colocaron moscas de estas especies en cajas especiales de metacrilato y metal, sustituyendo los frutos, sustratos habituales de desarrollo de los embriones, con sustratos artificiales hechos con agar al 3% y teñidos con colorante no tóxico (anilina). Se dejó que las hembras pusieran huevos, como mucho, durante dos horas. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la recolección de los embriones y la inmediata inyección del ARN de doble cadena. También se efectuó un experimento control, inyectando en los embriones solamente el tampón de microinyección. La inyección se realizó en el tercio posterior del embrión, según su longitud, siguiendo el protocolo descrito para *Drosophila* por Kennerdel y Carthew (1998). A los dos días, los embriones alcanzaron el estadio larvario y se transfirieron a guayabas (*Psidium guayaba*) donde se desarrollaron hasta alcanzar el estadio de pupa. Dichas pupas se recolectaron y se colocaron nuevamente en las cajas de metacrilato y metal, hasta la eclosión de los adultos.

3.1.2 Preparaciones cromosómicas

Para analizar la constitución cromosómica de los machos pertenecientes a la especie *A. aff. fraterculus* sp. 1 procedentes de la microinyección se diseccionaron los testículos de machos adultos (como máximo de dos días de edad). Estos se utilizaron para llevar a cabo las preparaciones de cromosomas, siguiendo el protocolo descrito

en Selivon y Perondini (1997) y en Goday *et al.* (2006). El resto de los machos adultos se utilizaron para estudiar la expresión de los genes *tra* y *dsx*.

3.1.3 Análisis de la expresión de los genes *transformer* y *doublesex* de *Anastrepha aff. fraterculus* sp. 1

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron a partir de 1µg de ARN total de macho adulto. En el caso del gen *tra*, se usó el cebador "*traAo39*" (Ruiz *et al.*, 2007a) para la retrotranscripción, mientras que en el caso de *dsx*, se utilizó un oligo "*d(T)*". Las reacciones de amplificación (PCR) se llevaron a cabo utilizando 1µl de ADNc en un volumen final de 50µl. Las condiciones empleadas fueron las siguientes: Buffer 1x, 1.5mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada cebador y 2U de Taq polimerasa (Invitrogen). Las parejas de cebadores que se utilizaron para amplificar el ADNc del gen *tra* fueron: "*traAo41*" y "*traAo44*" (Ruiz *et al.*, 2007a). Para amplificar el ADNc correspondiente al gen *dsx*, fue necesario utilizar distintas parejas de cebadores: "*dsxAo26*" localizado en el exón 2 común a ambos sexos y, alternativamente, o "*dsxAo32F*" (para amplificar el transcrito específico de hembra) o "*dsxAo35M*" (para amplificar el transcrito específico de macho) (Ruiz *et al.*, 2007). En todos los casos, el programa de amplificación fue el siguiente: un primer ciclo de 5 minutos a 95°C; 50 ciclos, cada uno de ellos compuesto por: 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 42°C y 30 segundos a 72°C; una elongación final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

V. Resultados

1. Aislamiento, organización molecular y transcritos del gen *transformer-2* de *Anastrepha obliqua*

A continuación se describe la estrategia llevada a cabo para el aislamiento del gen *tra-2* de *A. obliqua* (*Aotra-2*) y para la caracterización de su organización molecular.

El primer paso fue realizar una RT-PCR sobre ARN total de hembras adultas, usando para la retrotranscripción un cebador "oligo-dT". Como cebadores de la PCR se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos degenerados, sintetizados a partir de las secuencias pertenecientes a las regiones conservadas del dominio RRM del gen *tra-2* de los dípteros *M. domestica*, *Drosophila. virilis* y *D. melanogaster* (Tabla 2). Se amplificó un fragmento de 92 pares de bases que fue clonado y secuenciado. Su secuencia putativa de aminoácidos mostraba un alto grado de similitud con la región 3' del dominio RRM de la proteína Tra2 de *D. melanogaster*. Este resultado indicaba que se había aislado un fragmento del gen *Aotra-2*.

El segundo paso consistió en amplificar la unidad de transcripción completa del gen *Aotra-2* de *A. obliqua*. Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos "GW1" y "GW2" (Tabla 2 y Figura 7), a partir de la secuencia inicial amplificada. Dichos cebadores se utilizaron en ensayos de 5'RACE y 3'RACE, usando como molde ARN total de macho y de hembra, separadamente. En el experimento 5'RACE se amplificaron los mismos fragmentos tanto en machos como en hembras (Figura 8). En el ensayo 3'RACE se amplificaron varios fragmentos que eran los mismos en ambos sexos (Figura 8). Los fragmentos de mayor tamaño se clonaron y se secuenciaron y las secuencias putativas de aminoácidos se compararon, *in silico*, con la secuencia de las proteínas Tra2 de *D. melanogaster*. El ensayo 5'RACE permitió identificar el extremo amino-terminal de la proteína putativa Tra2 de *A. obliqua* y la región 5'UTR de su ARNm. El ensayo 3'RACE permitió identificar el extremo carboxilo-terminal de la mencionada proteína putativa y la región 3'UTR de su ARNm.

El tercer paso consistió en caracterizar la región genómica correspondiente al gen *Aotra-2*. Para tal propósito se sintetizó una genoteca genómica de adultos de *A. obliqua* (véase apartado 2.2 de Materiales y métodos) que se utilizó en ensayos de paseo cromosómico ("*Genome Walker*"). Para este ensayo se emplearon los cebadores "GW1" y "GW2" y el fragmento de 92 pb, amplificado inicialmente, fue el molde. Los fragmentos genómicos amplificados se clonaron y secuenciaron. Este proceso se repitió hasta conseguir la secuencia genómica completa del gen. La secuencia y localización de los cebadores utilizados se muestran, respectivamente, en la Tabla 2 y en la Figura 7.

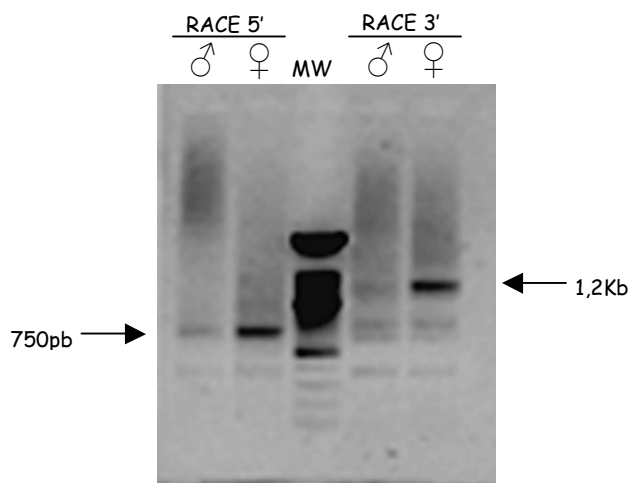


Figura 8. RACE 5' y 3'. Los ensayos se realizaron usando como molde ARN mensajero de macho y hembra, separadamente. MW indica el marcador de peso molecular "Molecular Weight Marker XIV" de Roche.

La comparación de las secuencias genómicas con las secuencias de ADNc obtenidas previamente, permitió determinar las uniones exón-intrón, obteniéndose así la organización molecular del gen *tra-2* de *A. obliqua*.

La unidad completa de transcripción de *Aotra-2* está compuesta por 3635 pb (Anexo 1). Éste consta de ocho exones y siete intrones, cuyos tamaños se muestran en la tabla 3. Se identificó un único transcrito formado por 1923 pares de bases. Esto fue confirmado por ensayos de RT-PCR solapantes sobre ARN total de machos y hembras separadamente, usando los cebadores mostrados en la Tabla 2 y en la Figura 7.

La comparación de la secuencia genómica correspondiente a la región 5' del gen *Aotra-2* con la secuencia de ADNc permitió determinar la longitud de la región 5' UTR. Sin embargo, debido a la ausencia de cajas TATA, no fue posible identificar la región promotora del gen *Aotra-2*. No obstante, sobre la base de las secuencias analizadas del experimento de 5' RACE y al programa "Neural Network Promoter Prediction" (www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) podemos determinar que el inicio putativo de la transcripción se encuentra localizado 306 pb aguas arriba del codón de inicio de la traducción.

Se encontró un único sitio de inicio de la traducción, constituido por los tres últimos nucleótidos del primer exón, así como un único sitio de parada de la traducción, localizado a 15 nucleótidos del inicio del exón 8. Este único marco abierto de lectura está formado por 749 pares de bases (Anexo 2).

<i>Exón 1</i> (pb)	<i>Intrón 1</i> (pb)	<i>Exón 2</i> (pb)	<i>Intrón 2</i> (pb)	<i>Exón 3</i> (pb)	<i>Intrón 3</i> (pb)	<i>Exón 4</i> (pb)	<i>Intrón 4</i> (pb)	<i>Exón 5</i> (pb)	<i>Intrón 5</i> (pb)	<i>Exón 6</i> (pb)	<i>Intrón 6</i> (pb)	<i>Exón 7</i> (pb)	<i>Intrón 7</i> (pb)	<i>Exón 8</i> (pb)
309	299	80	74	126	870	78	67	129	268	176	69	140	65	885

Tabla 3. El gen *tra-2* de *A. obliqua*. Se indica el número de nucleótidos (pb) que componen los ocho exones y los siete intrones del gen *Aotra-2*. El tamaño completo del gen corresponde a 3635 pb.

2. Comparación de la organización molecular del gen *transformer-2* de *Anastrepha obliqua* con el gen *transformer-2* de otros insectos

La Figura 9 muestra la organización molecular del gen *Aotra-2* y su comparación con los genes *tra-2* de las especies *C. capitata* (Figura 9B) y *D. melanogaster* (Figura 9C).

El número de exones varía: el gen *tra-2* de *Anastrepha* y el de *Ceratitidis* están formados por 8 exones (teniendo en cuenta los exones 6a y 6b en *Ceratitidis*), mientras que el gen *tra-2* de *Drosophila* está compuesto por 7 exones.

Todas las uniones exón-intrón son las típicas (consenso), es decir, GT/AG. Las uniones exón-intrón varían entre las especies con la excepción de la unión correspondiente a los exones E5 y E6, la cual se localiza en el mismo sitio en todas las especies analizadas.

La proteína putativa codificada por el gen *Aotra-2* está formada por 249 aminoácidos y muestra las características que definen a las proteínas pertenecientes a la familia SR. Estas características corresponden a un dominio RRM de unión a ARN, flanqueado por dos dominios SR ricos en dipéptidos arginina-serina, responsables de la interacción entre proteínas (Figura 9A). El dominio RS1 estaría codificado por parte del exón 2, el exón 3 completo y la región 5' del exón 4; el dominio RRM estaría codificado por la mayor parte del exón 5 y el exón 6; el dominio RS2 estaría codificado por el exón 7 y una pequeña región del inicio del exón 8 (Figura 9A). Las secuencias codificantes estos dominios conservados ocupan aproximadamente las mismas posiciones, tanto en el *tra-2* de *C. capitata* como en el *tra-2* de *D. melanogaster* (identificados con los mismos colores en la Figura 9). En *C. capitata* el RS1 estaría codificado por los exones 2, 3 y parte del 4; el RRM por parte de los exones 5 y 6 y el RS2 por parte de los exones 6b y 7 (Figura 9B). En *D. melanogaster* parte de los exones 2 y 4 y el exón 3 completo codificarían el dominio RS1; partes de los exones 5 y 6 codificarían el RRM y partes del 6 y del 7 codificarían el dominio RS2 (Figura 9C).

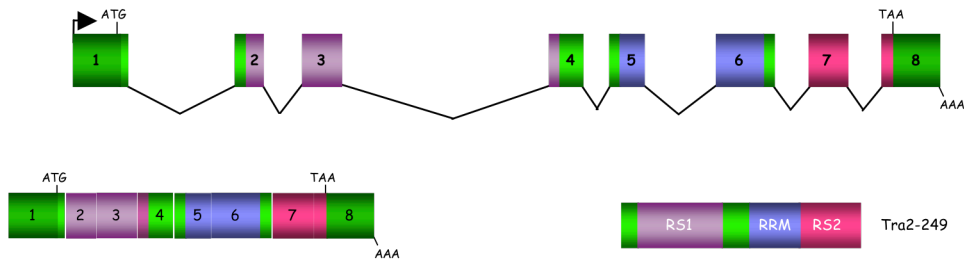
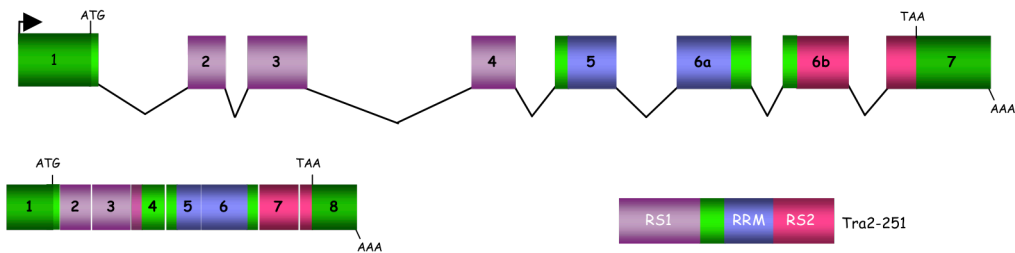
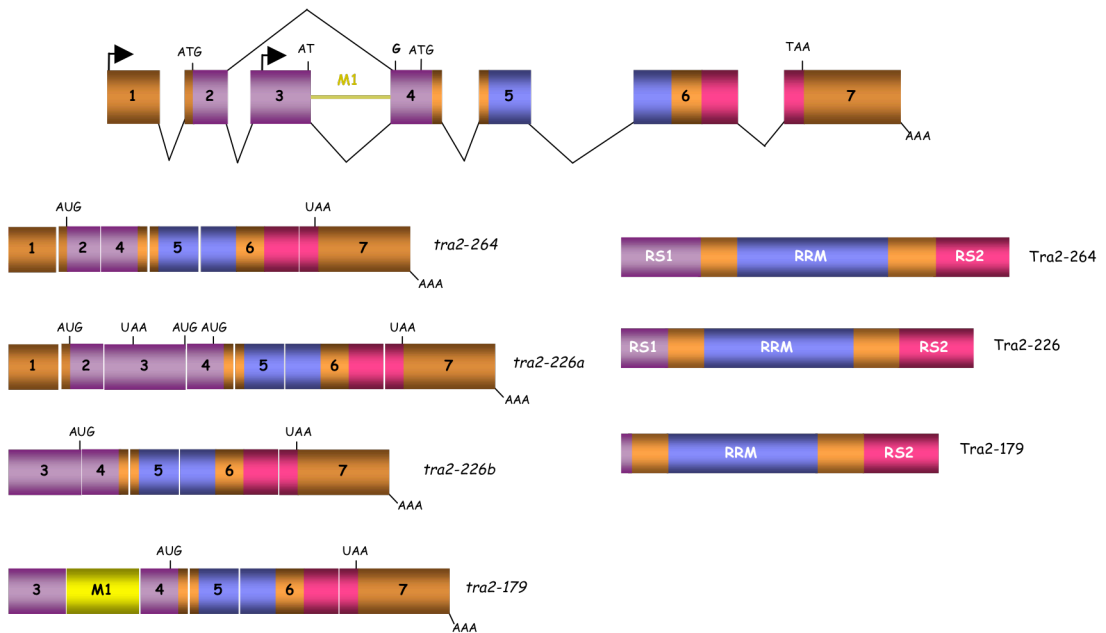
A) *Anastrepha obliqua*B) *Ceratitidis capitata*C) *Drosophila melanogaster*

Figura 9. Organización molecular de los genes *tra-2* de *A. Obliqua* (A), *C. Capitata* (B) y *D. melanogaster* (C). Los rectángulos coloreados representan los exones. En morado y en rosa se representan, respectivamente, los dominios RS1 y RS2 y en azul el dominio RRM. En verde (A-B) y en naranja (C) se han coloreado las regiones exónicas que no corresponden a ningún dominio particular y las regiones 3' y 5' UTR. Las líneas negras representan el procesamiento del transcrito primario de los diferentes genes. Se indican: el sitio de inicio de la transcripción (flechas negras), los sitios de inicio (ATG) y terminación (TAA) de la traducción y los sitios de poliadenilación (AAA).

3. Expresión del gen *transformer-2* de *Anastrepha obliqua*

La expresión del gen *Aotra-2* se analizó mediante RT-PCR, usando como molde ARN total procedente de soma de macho (sin gónadas), soma de hembra (sin gónadas), una mezcla de larvas macho y larvas hembra, una mezcla de embriones de ambos sexos y ovarios de hembras adultas. Se utilizó el cebador "oligo-dT" para la reacción de retrotranscripción y la pareja de cebadores "GW1" y "P4" para la de PCR (Figura 10A). En todos los casos, se amplificó el fragmento esperado de 368 pb. Dicho fragmento fue clonado y secuenciado para confirmar que se correspondía con el fragmento esperado del gen *Aotra-2*. Los controles negativos del PCR (véase Materiales y métodos, apartado 2.1.10) no produjeron amplificaciones.

Gracias a estos resultados, se puede afirmar que el gen *Aotra-2* se expresa durante todo el desarrollo y en la vida adulta de ambos sexos. Este gen también se expresa en ovarios adultos, lo que sugiere que podría haber expresión materna (Figura 10B).

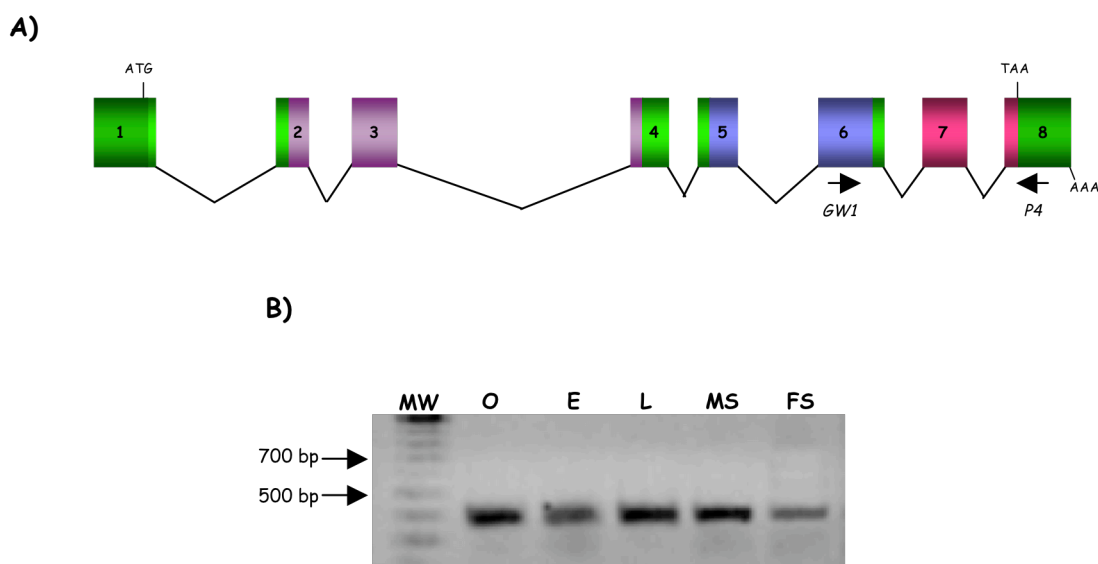


Figura 10. Expresión del gen *Aotra-2*. **(A)** Localización, a nivel del gen *Aotra-2*, de los cebadores "GW1" y "P4", empleados en las reacciones de PCR (flechas). Los rectángulos coloreados representan los exones. Las líneas negras representan el procesamiento del transcrito primario. Se señalan los sitios de inicio (ATG) y terminación (TAA) de la traducción y el sitio de poliadenilación (AAA). **(B)** Patrón de expresión de *Aotra-2* en: ovario (O); embriones macho y hembra (E); larvas macho y hembra (L); soma de macho (cabeza y tórax) (MS); soma de hembra (cabeza y tórax) (FS). MW se refiere al marcador de peso molecular "Molecular Weight Marker XIV" de Roche.

Como se mencionó en la Introducción, el gen *tra-2* de *D. melanogaster* produce un transcrito, *tra2-179*, específico de la línea germinal del macho adulto. Este transcrito se caracteriza por contener el intrón M1, el cual introduce codones de parada de la traducción en el ARNm. De este modo, se produce una proteína Tra2 truncada no

funcional. Este transcrito aberrante constituye alrededor del 50% del ARNm total producido por *tra-2* en el testículo (Mattox et al, 1990). La retención del intrón M1 es el mecanismo por medio del cual la proteína Tra2 funcional limita su propia síntesis, puesto que la cantidad final de esta proteína es crucial para la fertilidad del macho. Es necesario que se mantengan los niveles fisiológicos de proteína Tra2 funcional para que tenga lugar una espermatogénesis normal (McGuffin et al., 1998). Esta regulación negativa de la proteína Tra2 se implementa por la unión de dicha proteína a las secuencias ISS localizadas en el intrón M1 (Qi et al., 2007).

Aunque en los análisis iniciales del aislamiento del gen *Aotra-2* solamente se identificó un único transcrito, cabía la posibilidad de que, como en *Drosophila*, existiese un transcrito específico del testículo. Si este transcrito no se detectaba analizando machos adultos completos, podría deberse a que este último transcrito no estuviese muy representado. Para verificar esta hipótesis se decidió efectuar un análisis más preciso, utilizando solamente los testículos de individuos adultos. Lo primero fue analizar la secuencia genómica completa para intentar detectar secuencias ISS, las cuales se encontraron en los intrones 1 y 3 (Figura 11A; resaltadas con un recuadro en el Anexo 1). El segundo paso fue investigar la posible producción de cantidades significativas de mensajeros alternativos que contuvieran ambos intrones o, por lo menos, uno de ellos. Se habría esperado encontrar un ARNm alternativo que, como en el caso de *Drosophila*, produjese una proteína Tra2 trunca. En este caso, se habría podido proponer un posible mecanismo de autorregulación negativa de *tra-2* en los testículos adultos de *Anastrepha*.

Con este fin, se efectuaron experimentos de PCR sobre ADNc, obtenido por retrotranscripción (usando el cebador "oligo-dT") del ARN total procedente de testículo de macho adulto de la especie *A. obliqua*. Se usaron dos parejas de cebadores "PM1" y "P2" (localizados, respectivamente, al principio del intrón 3 y en el exón 4) y "P1" y "P2" (localizados en los exones 1 y 4, respectivamente) (Figura 11A y Tabla 2). Con la primera pareja de cebadores se amplificaron dos fragmentos de aproximadamente 200 y 900 pb, respectivamente (Figura 11B, carril 1). Por el tamaño, el fragmento mayor podría corresponder a un transcrito que incluyese el intrón 3. Con la segunda pareja de cebadores, se amplificó un único fragmento de unas 300 pb que, por tamaño, correspondería al ARNm que codifica la proteína Tra2 funcional, lo que se confirmó clonando y secuenciando este fragmento. Los controles negativos del ensayo PCR no produjeron amplificación (datos no mostrados). No se pudo confirmar, sin embargo, el origen de los fragmentos de 200 y 900 pb pues su clonación no fue posible.

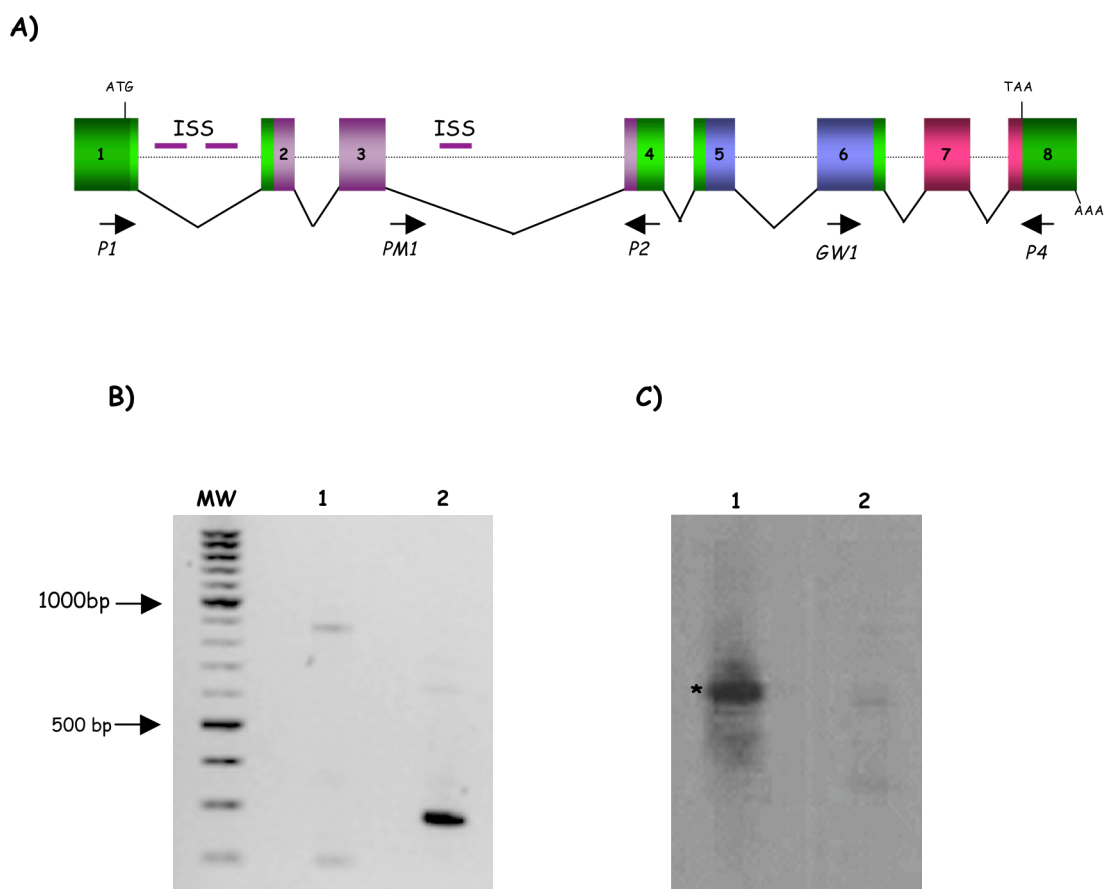


Figura 11. Expresión del gen *Aotra-2* en los testículos del macho adulto. (A) Localización, a nivel del gen *Aotra-2*, de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR (flechas). Localización de las secuencias ISS en los intrones 2 y 3 (líneas moradas). Los rectángulos coloreados corresponden a los exones, mientras el procesamiento del transcrito primario se representa con las líneas negras oblicuas. Se señalan los sitios de inicio (ATG) y terminación (TAA) de la traducción y el sitio de poliadenilación (AAA). **(B)** PCR con los cebadores "PM1" y "P2" (carril 1) y "P1" y "P2" (carril 2). **(C)** "Southern blot" correspondiente al gel de la Figura 11B hibridado con una sonda específica para el intrón 3 del gen *Aotra-2*. El asterisco indica una banda de 900 pares de bases que se correspondería a la banda detectada en el carril 1 de la Figura 11B. MW hace referencia al marcador de peso molecular "Molecular Weight Marker XIV" de Roche.

Para verificar si alguno de los fragmentos no secuenciados contenía el intrón 3, se llevó a cabo un "Southern blot" con dichos fragmentos, utilizándose como sonda una secuencia complementaria a la región del intrón 3 del gen *Aotra-2*. Solamente el fragmento de unas 900 pb hibridó con la sonda (Figura 11C, carril 1). El fragmento de 200 pb del carril 1 y el fragmento de 300 pb del carril 2 no hibridaron, como se esperaba, pues la sonda es específica para el intrón 3.

Estos resultados confirman que el testículo de *A. obliqua* produce un transcrito específico, similar al transcrito *tra2-179* de *Drosophila*, poco representado respecto al transcrito ubicuo. Dicho transcrito, al contrario de lo que ocurre en *Drosophila*, se expresa a partir del mismo promotor usado en el soma.

4. La proteína Transformer2 de *Anastrepha* y de otros insectos

Para caracterizar la proteína Tra2 de otras especies pertenecientes al género *Anastrepha*, se asumió que el gen *tra-2* de estas especies poseería una organización similar al gen *tra-2* de *A. obliqua* como ya se demostró anteriormente en el caso de los genes *tra* (Ruiz *et al.*, 2007b) y *dsx* (Ruiz *et al.*, 2007a) de dichas especies.

El ARN total extraído de hembras adultas pertenecientes a cada una de estas especies se usó como molde para reacciones de RT-PCR. Para la reacción de retrotranscripción se usó el cebador "P4" (Tabla 2 y Figura 7), localizado en la región 3'UTR del gen *Aotra-2*. Para las reacciones de PCR se usó la pareja de cebadores: "P5", localizado en la región 5' UTR de *Aotra-2* y "P2" (Tabla 2 y Figura 7). De esta forma, se amplificaron los marcos abiertos de lectura completos del gen *tra-2* en diez especies de *Anastrepha* (Anexo 2). Los amplicones obtenidos fueron clonados, secuenciados y traducidos, *in silico*, usando programas informáticos apropiados (véase Materiales y métodos, apartado 2.1). La comparación de las proteínas se llevó a cabo tanto a nivel de las secuencias completas como a nivel de las secuencias específicas de los distintos dominios RS1, RS2, RRM y la región "linker" (Figura 12). Se determinó también el contenido de dipéptidos RS (arginina-serina). Las relaciones filogenéticas de las proteínas Tra2 de los insectos donde han sido caracterizadas se muestran en el Anexo 3.

El número de aminoácidos que componen la proteína putativa Tra2 de todas las especies de *Anastrepha* analizadas es de 249 aminoácidos. El número de éstos que componen cada uno de los dominios de Tra2 es el mismo para todas estas especies. El grado de similitud (aminoácidos idénticos más los cambios conservativos) entre ellas resultó ser muy elevado, tanto en lo que se refiere a la proteína completa (97,2-100%) (Tabla 4A) como en lo referido a cada uno de sus dominios: RS1 (95,6-100%) (Tabla 5A); RS2 (94,3-100%) (Tabla 6A); RRM (97,2-100%) (Tabla 7A) y la región "linker" (100%) (Tabla 8A). El contenido de dipéptidos RS fue de 11 para el dominio RS1 y de 6 para el dominio RS2, en todas las especies.

La proteína Tra2 de *Anastrepha* y la de los otros insectos donde dicha proteína ha sido caracterizada se compararon, respecto a su secuencia completa como respecto a cada uno de sus dominios (Figura 12). Se utilizó la secuencia de Tra2 de *A. obliqua* como

referencia de las especies de *Anastrepha*. El número de aminoácidos que componen las proteínas Tra2 varía entre las distintas especies. Las proteínas de *C. capitata* y *B. oleae* poseen 251 aminoácidos; Tra2 de *M. domestica* presenta 232 aminoácidos, mientras que la de *Lucilia cuprina* posee 271 aminoácidos. Las proteínas Tra2 de *D. melanogaster*, *D. virilis* y *Drosophila pseudoobscura* están formadas por 264, 315 y 248 aminoácidos, respectivamente. Finalmente, los aminoácidos que componen la secuencia de esta proteína en el lepidóptero *Bombyx mori* son 284 y los de los himenópteros *Apis mellifera* y *Nasonia vitripennis*, son 269 y 307, respectivamente (Tabla 4B).

```

10      20      30      40      50      60      70
A.obliqua      --MSPRT-----RSRSISFR-----RSYSKSPARRSNGRRRHSREKVVNSRSR
A.fraterculus.sp1
A.fraterculus.sp2
A.fraterculus.sp3
A.fraterculus.sp4
A.grandis
A.serpentina
A.sororcula
A.striata
A.bistrigata
A.amita
B.oleae
C.capitata
M.domestica
L.cuprinia
D.melanogaster
D.virilis
D.pseudoobscura
B.mori
A.mellifera
N.vitripennis

```

```

80      90      100     110     120     130     140
A.obliqua      SASRHP-----PSPPLPAGRAG-RYS DASKSSSTPLSPRHGRR-----VSRSR
A.fraterculus.sp1
A.fraterculus.sp2
A.fraterculus.sp3
A.fraterculus.sp4
A.grandis
A.serpentina
A.sororcula
A.striata
A.bistrigata
A.amita
B.oleae
C.capitata
M.domestica
L.cuprinia
D.melanogaster
D.virilis
D.pseudoobscura
B.mori
A.mellifera
N.vitripennis

```

```

150     160     170     180     190     200     210
A.obliqua      SRSPYDKR-RANREK-----PVQNRCLGVFGLSVYTTQOKIRDIFSRRFGPIERTQVVIDAQTGRSGC
A.fraterculus.sp1
A.fraterculus.sp2
A.fraterculus.sp3
A.fraterculus.sp4
A.grandis
A.serpentina
A.sororcula
A.striata
A.bistrigata
A.amita
B.oleae
C.capitata
M.domestica
L.cuprinia
D.melanogaster
D.virilis
D.pseudoobscura
B.mori
A.mellifera
N.vitripennis

```

```

220     230     240     250     260     270     280
A.obliqua      FYIYQDIADAKAAKDACSGTEIDRRIRVDYSTTQRPHTPTPGVYMGRYTRERDHI
A.fraterculus.sp1
A.fraterculus.sp2
A.fraterculus.sp3
A.fraterculus.sp4
A.grandis
A.serpentina
A.sororcula
A.striata
A.bistrigata
A.amita
B.oleae
C.capitata
M.domestica
L.cuprinia
D.melanogaster
D.virilis
D.pseudoobscura
B.mori
A.mellifera
N.vitripennis

```

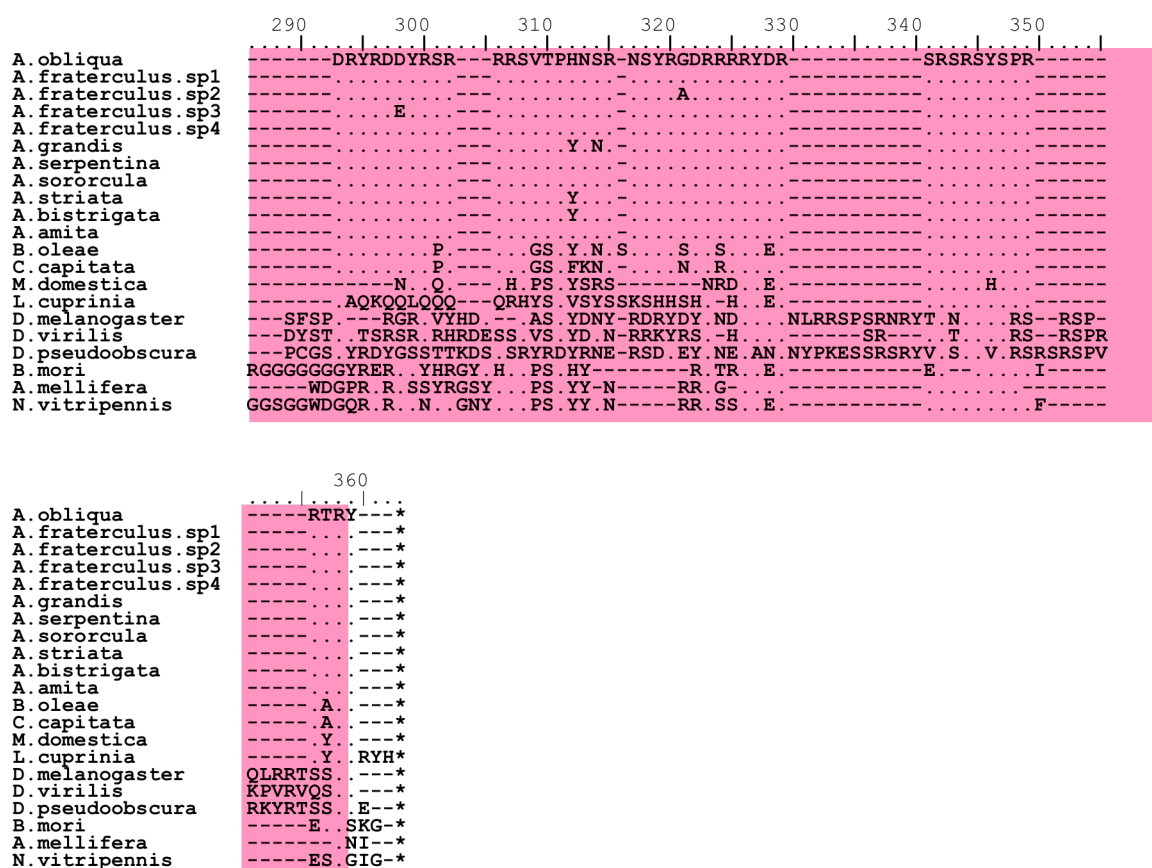


Figura 12. Alineamiento de las proteínas Tra2. La comparación de las proteínas se llevó a cabo mediante el programa ClustalW. En morado se señala el dominio RS1, en azul el dominio RRM y en rosa el dominio RS2. Los puntos representan aminoácidos idénticos, mientras los guiones señalan deleciones de aminoácidos en la correspondiente posición. Los rectángulos evidencian las secuencias consenso RNP-1 y RNP-2 de unión a ribonucleoproteína. Este análisis se ha desarrollado sobre secuencias ortólogas de *tra-2* pertenecientes a 21 diferentes insectos. Los números de acceso de dichas secuencias son los siguientes: Diptera: *A. amita* (FN658617), *A. bistrigata* (FN658616), *A. aff. fraterculus* sp. 1 (FN658608), *A. aff. fraterculus* sp. 2 (FN658609), *A. aff. fraterculus* sp. 3 (FN658610), *A. aff. fraterculus* sp. 4 (FN658611), *A. grandis* (FN658612), *A. obliqua* (FN658607), *A. serpentina* (FN658613), *A. sororcula* (FN658614), *A. striata* (FN658615), *C. capitata* (EU999754), *B. oleae* (AJ547623), *M. domestica* (AY847518), *L. cuprina* (FJ461620), *D. melanogaster* (M23633), *D. virilis* (XM_002049663), *D. pseudoobscura* (XM_001360568); Lepidoptera: *B. mori* (NM_001126233); Himenoptera: *A. mellifera* (XM_001121070), *N. vitripennis* (XP_001601106).

El número de aminoácidos que componen los dominios RS1 (Tabla 5B) y RS2 (Tabla 6B) varía entre las distintas especies, mientras que el dominio RRM (Tabla 7B) y la región "linker" (Tabla 8B), que une este último dominio con el dominio RS2, están formados por el mismo número de aminoácidos en todas las especies analizadas.

El porcentaje de similitud de las proteínas Tra2 es mayor entre los dípteros que entre estos últimos y lepidópteros e himenópteros (Tabla 4B). El mayor porcentaje de

similitud se encuentra entre las proteínas Tra2 de los tefrítidos *Anastrepha*, *Ceratitis* y *Bactrocera* (entre un 83,9% y 86,3%), después entre éstos y *Lucilia* (57,4%-58,9%), *Musca* (48,3%-57,7%), *Drosophila* (36,7%-49,6%), *Apis* (58,7%) y *Bombyx* (48,2%) (Tabla 4B). Esta relación se mantiene entre los dominios. El dominio RRM (similitud 56,9-98,6%) (Tabla 7B) y la región "linker" (similitud 66,7-100%) (Tabla 8B) son los más conservados, mientras que la variabilidad en la similitud de los dominios RS1 (Tabla 5B) y RS2 (Tabla 6B) es mayor, entre 17,4 y 81,5% para RS1 y entre 21,8 y 82,7% para RS2. El contenido en dipéptidos RS es diferente entre las especies (Tabla 9B), variando entre 6 y 10 para el dominio RS1 y entre 3 y 14 para el dominio RS2.

	<i>A.</i> <i>f. sp. 1</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>f. sp. 2</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>f. sp. 3</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>f. sp. 4</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>grandis</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>serpentina</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>sororcula</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>striata</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>bistrigata</i> (249aa)	<i>A.</i> <i>amita</i> (249aa)
<i>A.</i> <i>obliqua</i> (249aa)	98,8	97,9	98,4	98,4	97,6	97,2	97,5	97,9	97,6	98,4
<i>A.</i> <i>f. sp. 1</i>		99,2	99,6	99,6	98,8	98,4	98,8	99,2	98,8	99,6
<i>A.</i> <i>f. sp. 2</i>			98,8	98,8	97,9	97,6	97,9	98,4	97,9	98,8
<i>A.</i> <i>f. sp. 3</i>				99,2	98,4	97,9	98,4	98,8	98,4	99,2
<i>A.</i> <i>f. sp. 4</i>					98,4	97,9	98,4	98,8	98,4	100
<i>A.</i> <i>grandis</i>						97,2	97,6	98,8	98,4	98,4
<i>A.</i> <i>serpentina</i>							99,6	97,6	97,2	97,9
<i>A.</i> <i>sororcula</i>								97,9	97,6	98,4
<i>A.</i> <i>striata</i>									99,2	98,8
<i>A.</i> <i>bistrigata</i>										98,4

Tabla 4A. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) de las proteínas Tra2 de *Anastrepha*.

	<i>C. capitata</i> (251aa)	<i>B. oleae</i> (251aa)	<i>L. cuprina</i> (271aa)	<i>M. domestica</i> (232aa)	<i>D. melanogaster</i> (264aa)	<i>D. virilis</i> (269aa)	<i>D. pseudoobscura</i> (264aa)	<i>B. mori</i> (274aa)	<i>A. mellifera</i> (269aa)	<i>N. vitripennis</i> (269aa)
<i>A. obliqua</i> (249aa)	86,3	83,9	57,4	52,1	40,6	42,1	41,1	40,6	41,4	39,3
<i>C. capitata</i>		86,4	59,8	48,3	40,6	44,2	41,5	43,4	45,4	40,6
<i>B. oleae</i>			58,9	51,3	41,4	44,6	41,9	42,6	42,2	41,8
<i>L. cuprina</i>				57,7	36,7	39,4	39,5	40,2	41,6	36,9
<i>M. domestica</i>					41,8	41,8	40,1	41,4	46,9	43,9
<i>D. melanogaster</i>						51,5	49,6	35,6	37,5	36,3
<i>D. virilis</i>							46,8	36,7	37,1	37,9
<i>D. pseudoobscura</i>								35,6	36,4	32,9
<i>B. mori</i>									50,9	48,2
<i>A. mellifera</i>										58,7

Tabla 4B. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) de las proteínas Tra2 en Insectos.

	<i>A. f. sp. 1</i> (92aa)	<i>A. f. sp. 2</i> (92aa)	<i>A. f. sp. 3</i> (92aa)	<i>A. f. sp. 4</i> (92aa)	<i>A. grandis</i> (92aa)	<i>A. serpentina</i> (92aa)	<i>A. sororcula</i> (92aa)	<i>A. striata</i> (92aa)	<i>A. bistrigata</i> (92aa)	<i>A. amita</i> (92aa)
<i>A. obliqua</i> (92aa)	97,8	97,8	97,8	97,8	96,7	94,5	95,6	97,8	96,7	97,8
<i>A. f. sp. 1</i>		100	100	100	98,9	96,7	97,8	100	98,9	100
<i>A. f. sp. 2</i>			100	100	98,9	96,7	97,8	100	98,9	100
<i>A. f. sp. 3</i>				100	98,9	96,7	97,8	100	98,9	100
<i>A. f. sp. 4</i>					98,9	96,7	97,8	100	98,9	100
<i>A. grandis</i>						95,6	96,7	98,9	97,8	98,9
<i>A. serpentina</i>							98,9	96,7	95,6	96,7
<i>A. sororcula</i>								97,8	96,7	97,8
<i>A. striata</i>									98,9	100
<i>A. bistrigata</i>										98,9

Tabla 5A. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) del dominio RS1 de las proteínas Tra2 de *Anastrepha*.

	<i>C. capitata</i> (94aa)	<i>B. oleae</i> (92aa)	<i>L. cuprina</i> (111aa)	<i>M. domestica</i> (87aa)	<i>D. melanogaster</i> (84aa)	<i>D. virilis</i> (92aa)	<i>D. pseudoobscura</i> (57aa)	<i>B. mori</i> (109aa)	<i>A. mellifera</i> (113aa)	<i>N. vitripennis</i> (129aa)
<i>A. obliqua</i> (92aa)	81,5	78,2	46,7	35,6	21,4	20,6	26,3	27,2	27,2	26,1
<i>C. capitata</i>		76,1	48,9	34,5	22,6	21,7	26,3	27,6	32,9	27,7
<i>B. oleae</i>			45,6	32,2	23,8	17,4	29,8	30,4	31,5	27,2
<i>L. cuprina</i>				35,6	26,2	19,6	28,1	23,8	28,8	25,2
<i>M. domestica</i>					22,6	20,7	26,3	25,3	28,7	28,7
<i>D. melanogaster</i>						38,1	36,8	23,8	28,6	27,4
<i>D. virilis</i>							29,8	21,7	21,7	20,6
<i>D. pseudoobscura</i>								33,3	36,8	31,6
<i>B. mori</i>									34,9	28,4
<i>A. mellifera</i>										57,5

Tabla 5B. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) del dominio RS1 de las proteínas Tra2 en Insectos.

	<i>A. f. sp. 1</i> (53aa)	<i>A. f. sp. 2</i> (53aa)	<i>A. f. sp. 3</i> (53aa)	<i>A. f. sp. 4</i> (53aa)	<i>A. grandis</i> (53aa)	<i>A. serpentina</i> (53aa)	<i>A. sororcula</i> (53aa)	<i>A. striata</i> (53aa)	<i>A. bistrigata</i> (53aa)	<i>A. amita</i> (53aa)
<i>A. obliqua</i> (53aa)	100	98,1	98,1	98,1	96,2	100	100	98,1	98,1	98,1
<i>A. f. sp. 1</i>		98,1	98,1	98,1	96,2	100	100	98,1	98,1	98,1
<i>A. f. sp. 2</i>			96,2	96,2	94,3	98,1	98,1	96,2	96,2	96,2
<i>A. f. sp. 3</i>				96,2	94,3	98,1	98,1	96,2	96,2	96,2
<i>A. f. sp. 4</i>					94,3	98,1	98,1	96,2	96,2	100
<i>A. grandis</i>						96,2	96,2	98,1	98,1	94,3
<i>A. serpentina</i>							100	98,1	98,1	98,1
<i>A. sororcula</i>								98,1	98,1	98,1
<i>A. striata</i>									100	96,2
<i>A. bistrigata</i>										96,2

Tabla 6A. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) del dominio RS2 de las proteínas Tra2 de *Anastrepha*.

	<i>C. capitata</i> (55aa)	<i>B. leae</i> (52aa)	<i>L. cuprina</i> (55aa)	<i>M. domestica</i> (42aa)	<i>D. melanogaster</i> (75aa)	<i>D. virilis</i> (74aa)	<i>D. pseudoobscura</i> (85aa)	<i>B. mori</i> (70aa)	<i>A. mellifera</i> (49aa)	<i>N. vitripennis</i> (70aa)
<i>A. obliqua</i> (53aa)	71,1	66,0	34,0	42,8	34,0	37,7	34,0	26,4	42,8	32,1
<i>C. capitata</i>		82,7	38,5	40,5	34,6	40,4	34,6	26,9	45,0	33,0
<i>B. oleae</i>			36,4	40,5	27,3	41,8	29,1	29,1	40,8	34,5
<i>L. cuprina</i>				50,0	21,8	30,1	25,4	23,6	30,6	29,1
<i>M. domestica</i>					28,6	38,1	33,3	30,9	47,6	42,8
<i>D. melanogaster</i>						28,4	36,0	22,8	30,6	22,8
<i>D. virilis</i>							36,5	22,8	32,6	28,6
<i>D. pseudoobscura</i>								24,3	28,6	25,7
<i>B. mori</i>									38,8	32,9
<i>A. mellifera</i>										61,2

Tabla 6B. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) del dominio RS1 de las proteínas Tra2 en Insectos.

	<i>A. f. sp. 1</i> (72aa)	<i>A. f. sp. 2</i> (72aa)	<i>A. f. sp. 3</i> (72aa)	<i>A. f. sp. 4</i> (72aa)	<i>A. grandis</i> (72aa)	<i>A. serpentina</i> (72aa)	<i>A. sororcula</i> (72aa)	<i>A. striata</i> (72aa)	<i>A. bistrigata</i> (72aa)	<i>A. amita</i> (72aa)
<i>A. obliqua</i> (72aa)	98,6	97,2	98,6	98,6	98,6	97,2	97,2	98,6	98,6	98,4
<i>A. f. sp. 1</i>		98,6	100	100	100	98,6	98,6	100	100	100
<i>A. f. sp. 2</i>			98,6	98,6	98,6	97,2	97,2	98,6	98,6	98,6
<i>A. f. sp. 3</i>				100	100	98,6	98,6	100	100	100
<i>A. f. sp. 4</i>					100	98,6	98,6	100	100	100
<i>A. grandis</i>						98,6	98,6	100	100	100
<i>A. serpentina</i>							100	98,6	98,6	100
<i>A. sororcula</i>								98,6	98,6	98,6
<i>A. striata</i>									98,6	98,6
<i>A. bistrigata</i>										100

Tabla 7A. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) del dominio RRM de las proteínas Tra2 de *Anastrepha*.

	<i>C. capitata</i> (72aa)	<i>B. oleae</i> (72aa)	<i>L. cuprina</i> (72aa)	<i>M. domestica</i> (72aa)	<i>D. melanogaster</i> (72aa)	<i>D. virilis</i> (72aa)	<i>D. pseudoobscura</i> (72aa)	<i>B. mori</i> (72aa)	<i>A. mellifera</i> (72aa)	<i>N. vitripennis</i> (72aa)
<i>A. obliqua</i> (72aa)	97,2	97,2	80,6	76,1	66,7	69,4	72,2	66,7	62,5	59,7
<i>C. capitata</i>		98,6	83,1	76,1	67,6	70,4	71,8	69,1	63,4	60,6
<i>B. oleae</i>			83,3	76,1	68,1	72,2	72,2	69,4	65,3	62,5
<i>L. cuprina</i>				78,9	69,0	70,4	69,0	64,8	66,2	60,6
<i>M. domestica</i>					67,6	70,4	71,8	69,1	63,4	60,6
<i>D. melanogaster</i>						83,3	77,8	56,9	58,3	58,3
<i>D. virilis</i>							79,2	61,1	63,9	59,7
<i>D. pseudoobscura</i>								58,3	61,1	59,7
<i>B. mori</i>									75	72,2
<i>A. mellifera</i>										80,6

Tabla 7B. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) del dominio RRM de las proteínas Tra2 en Insectos.

	<i>A. f. sp. 1</i> (18aa)	<i>A. f. sp. 2</i> (18aa)	<i>A. f. sp. 3</i> (18aa)	<i>A. f. sp. 4</i> (18aa)	<i>A. grandis</i> (18aa)	<i>A. serpentina</i> (18aa)	<i>A. sororcula</i> (18aa)	<i>A. striata</i> (18aa)	<i>A. bistrigata</i> (18aa)	<i>A. amita</i> (18aa)
<i>A. obliqua</i> (18aa)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>A. f. sp. 1</i>		100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>A. f. sp. 2</i>			100	100	100	100	100	100	100	100
<i>A. f. sp. 3</i>				100	100	100	100	100	100	100
<i>A. f. sp. 4</i>					100	100	100	100	100	100
<i>A. grandis</i>						100	100	100	100	100
<i>A. serpentina</i>							100	100	100	100
<i>A. sororcula</i>								100	100	100
<i>A. striata</i>									100	100
<i>A. bistrigata</i>										100

Tabla 8A. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) de la región linker de las proteínas Tra2 de *Anastrepha*.

	<i>C. capitata</i> (18aa)	<i>B. oleae</i> (18aa)	<i>L. cuprina</i> (18aa)	<i>M. domestica</i> (18aa)	<i>D. melanogaster</i> (18aa)	<i>D. virilis</i> (18aa)	<i>D. pseudoobscura</i> (18aa)	<i>B. mori</i> (18aa)	<i>A. mellifera</i> (18aa)	<i>N. vitripennis</i> (18aa)
<i>A. obliqua</i> (18aa)	100	100	88,9	77,8	77,8	88,8	77,8	77,8	72,2	66,7
<i>C. capitata</i>		100	88,9	77,8	77,8	88,8	77,8	77,8	72,2	66,7
<i>B. oleae</i>			88,9	77,8	77,8	88,8	83,3	77,8	72,2	66,7
<i>L. cuprina</i>				88,9	77,8	88,9	83,3	77,8	72,2	77,8
<i>M. domestica</i>					72,2	77,8	72,2	66,7	66,7	72,2
<i>D. melanogaster</i>						88,9	83,3	77,8	83,3	72,2
<i>D. virilis</i>							83,3	88,8	83,3	77,8
<i>D. pseudoobscura</i>								83,3	77,8	72,2
<i>B. mori</i>									94,4	88,9
<i>A. mellifera</i>										88,9

Tabla 8B. Porcentaje de similitud (identidad de aminoácidos y cambios conservativos) de la región linker de las proteínas Tra2 en Insectos.

	<i>A. obliqua</i>	<i>A. f. sp. 1</i>	<i>A. f. sp. 2</i>	<i>A. f. sp. 3</i>	<i>A. f. sp. 4</i>	<i>A. grandis</i>	<i>A. serpentina</i>	<i>A. sororcula</i>	<i>A. striata</i>	<i>A. bistrigata</i>	<i>A. amita</i>
<i>RS1</i>	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
<i>RS2</i>	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

Tabla 9A. Número de dipéptidos arginina-serina en los dominios RS1 y RS2 de las proteínas Tra2 de *Anastrepha*.

	<i>C. capitata</i>	<i>B. oleae</i>	<i>L. cuprina</i>	<i>M. domestica</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. virilis</i>	<i>D. pseudoobscura</i>	<i>B. mori</i>	<i>A. mellifera</i>	<i>N. vitripennis</i>
<i>RS1</i>	12	10	17	12	11	6	7	18	20	20
<i>RS2</i>	4	7	3	5	8	11	14	4	4	6

Tabla 9B. Número de dipéptidos arginina-serina en los dominios RS1 y RS2 de las proteínas Tra2 en Insectos.

5. El gen *transformer-2* se necesita para la determinación sexual en *Anastrepha*

El estudio funcional del gen *tra-2* en *Anastrepha* se abordó mediante la técnica del ARN de interferencia, la cual permite llevar a cabo análisis funcionales de genes en especies carentes de una genética desarrollada. Se trata de inyectar dsARN de *tra-2* de *A. obliqua* en embriones de *A. aff. fraterculus* sp. 1 (véase más adelante) para eliminar la función *tra-2* endógena y monitorizar eventuales alteraciones en el desarrollo sexual de las hembras que provienen de los embriones inyectados. Un imperativo de esta metodología es disponer de marcadores que permitan discernir, sin ambigüedades, si los machos (o intersexos) que sobreviven a la microinyección corresponden a hembras XX transformadas o a machos normales XY. No se conocen marcadores del cromosoma Y en *Anastrepha*, por lo tanto, para determinar el cariotipo de los machos adultos procedentes de los embriones inyectados, se diseccionaron sus testículos y se hicieron preparaciones cromosómicas (Figura 13). El dsARN inyectado, como mencionado anteriormente, correspondía a la ORF completa del gen *Aotra-2*. Dado que los cromosomas X e Y de esta especie son difícilmente distinguibles (Selivon *et al.*, 2005b), se utilizó la especie *A. aff. fraterculus* sp. 1, cuyos cromosomas X e Y son muy diferentes en su morfología (Figura 13A) (Selivon *et al.*, 2005a). Los genes *tra-2* de estas dos especies de *Anastrepha* poseen una alta similitud (Anexo 2), lo que hace posible el uso del dsARN de *Aotra-2* para destruir la función *tra2* endógena de *A. aff. fraterculus* sp. 1. Como control, se inyectó el tampón de resuspensión sin el dsARN *Aotra-2*. Los detalles experimentales se describen en el apartado 3.1 de Materiales y métodos. Los resultados de la microinyección se muestran en la tabla 10.

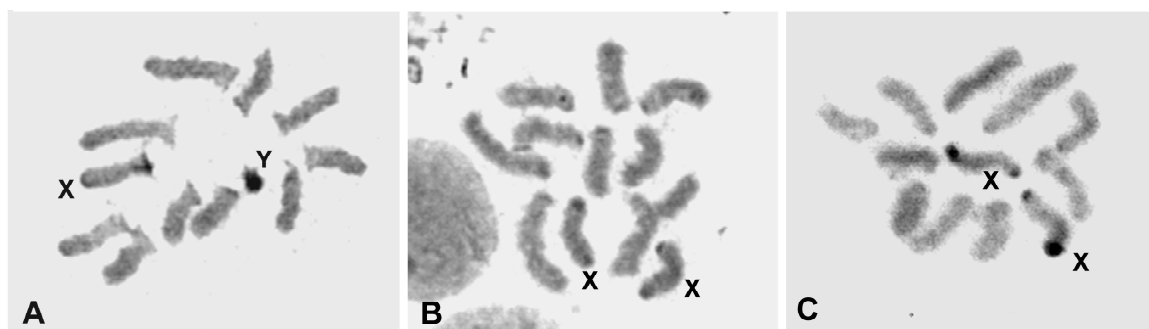


Figura 13. Cromosomas de *A. aff. fraterculus* sp. 1. (A) Cariotipo de un macho adulto normal. (B) Cariotipo de un pseudomacho adulto, desarrollado a partir de huevos inyectados con dsARN de *Aotra-2*. (C) Cariotipo de una hembra normal. X e Y son los cromosomas sexuales.

A)	N° de huevos inyectados	N° de larvas	N° de pupas	N° de adultos	
Control	1000	253 (25,3%)	59 (23,3%)	44 74,6%	
				21 Machos (47,7%)	23 hembras (52,3%)
dsRNA Aotra-2	1450	477 (32,9%)	124 (26,0%)	86 (69,3%)	
				76 machos (88,4%)	10 hembras (11,6%)

B) N° de machos adultos analizados	
Machos cromosómicamente normales (XY)	Pseudomachos (XX)
47 (35,5%)	11 (38,9%)

Tabla 10. Resultados obtenidos mediante la técnica ARNi. (A) Número de individuos y porcentaje de supervivencia a la microinyección del ARN de doble cadena de *Aotra-2* o del tampón de disolución de ARN, en embriones pertenecientes a la especie *A. aff. fraterculus* sp. 1. **(B)** Número de machos adultos procedentes de la microinyección sometidos a análisis cromosómico.

De los 1450 huevos experimentales inyectados, se obtuvieron 477 (32,9%) larvas, 124 (26,0%) se desarrollaron como pupas y 86 (69,3%) alcanzaron el estado adulto (76 machos [88,4%] y 10 hembras [11,6%]). De los 1000 huevos controles inyectados, se obtuvieron 253 (25,3%) larvas de las cuales 59 (23,3%) pasaron a pupa y 44 alcanzaron el estado adulto (21 machos [47,7%] y 23 hembras [52,3%]). El mayor número de machos adultos recuperados con respecto al de hembras, en la inyección experimental, es altamente significativo ($P < 0,0001$, test exacto de Fisher). Esto no se puede explicar por una eventual mayor sensibilidad de los embriones hembras a la inyección, la cual causaría una mayor letalidad, pues en el control se obtuvo prácticamente el mismo número de machos que de hembras ($P > 0,05$, test

exacto de Fisher). Estos resultados sugieren, en cambio, que la inyección del dsARN *Aotra-2* haría que algunos embriones con la constitución cromosómica típica de hembra (XX) se desarrollasen como machos (seudomachos), debido a la eliminación de la función *tra-2* endógena, causada por el dsARN *Aotra-2*. Ésto se confirmó con el análisis de la constitución cromosómica de los machos. De los 86 machos obtenidos, solamente se pudo obtener preparaciones cromosómicas de 58 de ellos. De los 58, 47 resultaron ser machos normales XY y los 11 restantes eran seudomachos XX (Tabla 10).

Todos los seudomachos XX tenían una terminalia externa normal de macho (Figura 5B). Sin embargo, cuando se diseccionaron sus testículos, se pudo observar que algunos de ellos poseían estructuras genitales internas tanto de macho como de hembra (Figura 14A-C).

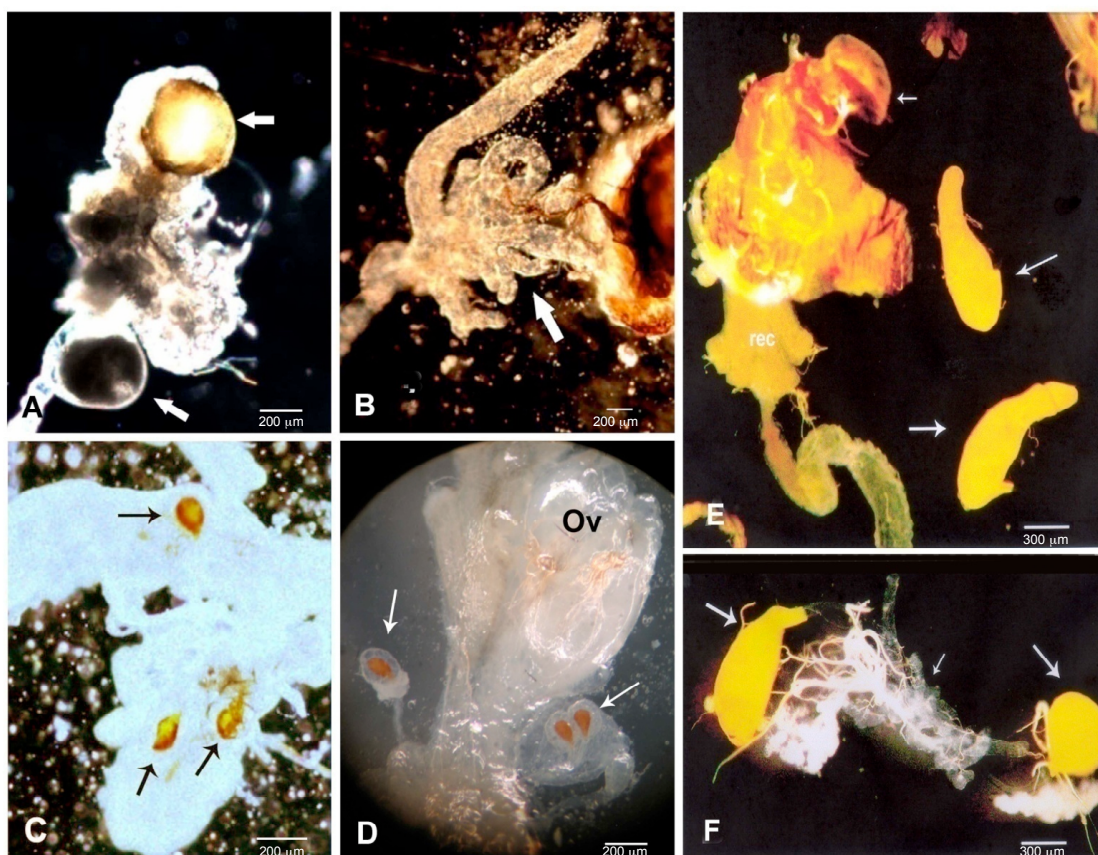


Figura 14. Genitalia interna y gónadas de *A. aff. fraterculus sp. 1*. (A-C) Seudomachos. Las flechas en (A) indican dos vesículas; una de ellas es amarilla, color típico del testículo normal. La flecha en (B) indica una glándula accesoria de macho. Las flechas en (C) señalan las espermatecas. (D) Hembra normal. Ov: ovario. (E) Macho normal. Las flechas largas indican los testículos; la flecha corta indica la terminalia externa; rec= rectum. (F) Seudomacho. Las flechas indican un testículo normal y otro asimétrico.

Otros pseudomachos tenían gónadas aberrantes: testículos no desarrollados totalmente o poseían un testículo normal y otro aberrante (Figura 14F). Estos resultados sugieren que en los pseudomachos XX, el procesamiento de los pre-ARNm de *tra* y *dsx* habría cambiado del tipo hembra al de tipo macho, como ocurre en el tefrítido *Ceratitis* (Salvemini *et al.*, 2009). Para confirmarlo, se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR sobre ARN total de estos pseudomachos a los cuales se les habían previamente quitado las gónadas para el estudio de su cariotipo.

En *Anastrepha*, la expresión del gen *tra* es ubicua en todo el desarrollo y durante la vida adulta. En las hembras (XX), el transcrito primario del gen *tra* produce, por procesamiento alternativo, tres diferentes ARNm (que difieren en el tamaño de la región 3'UTR), los cuales codifican la misma proteína Tra funcional. En los machos (XY), el procesamiento alternativo del transcrito primario de *tra* produce varios ARNm, los cuales codifican una proteína Tra truncada no funcional. Estos ARNm se diferencian en el número de exones específicos de macho que poseen (Ruiz *et al.*, 2007b). Para analizar el patrón de expresión del transcrito primario del gen *tra*, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR, utilizando los cebadores "*traAo41*" y "*traAo44*" que se diseñaron complementarios a secuencias de los exones 1 y 2, respectivamente, que flanquean los exones específicos de macho (Figura 15A).

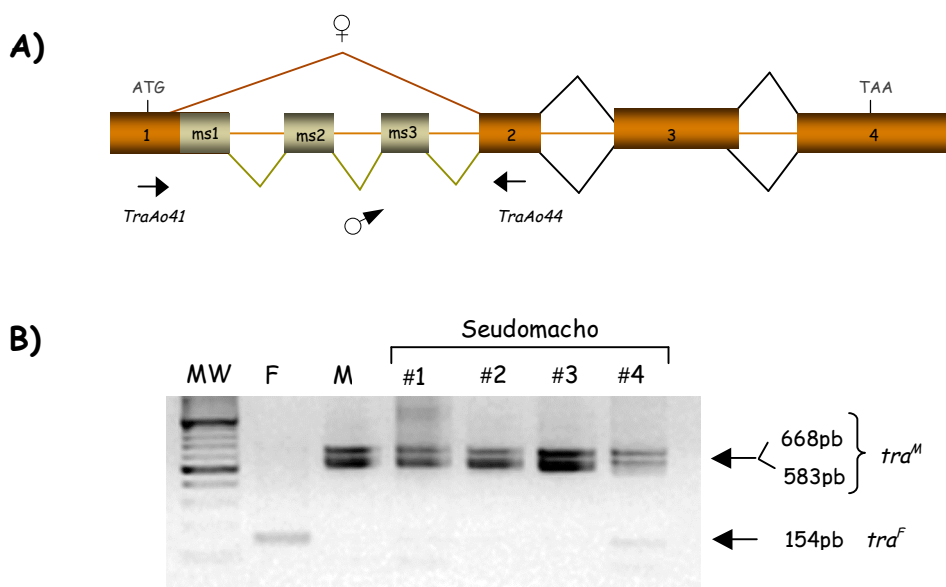


Figura 15. Análisis del procesamiento del transcrito primario del gen *tra* de pseudomachos de *A. aff. fraterculus sp. 1*. (A) Organización molecular del gen *tra*. Los exones se representan con rectángulos y los intrones con líneas. Las líneas oblicuas representan el procesamiento alternativo del transcrito primario en hembra (arriba) y en macho (abajo). Se indica la localización de los cebadores "*traAo41*" y "*traAo44*" utilizados; ms1-ms3 son los exones específicos de macho. (B) RT-PCR sobre ARN total de hembra normal (F); macho normal (M) y pseudomachos (#1, #2, #3, #4). Se indica el tamaño de los fragmentos correspondientes a las isoformas de macho (*tra^M*) y hembra (*tra^F*) amplificadas. MW hace referencia al marcador de peso molecular.

El ADNc se sintetizó con un "oligo-dT" a partir de ARN total. La Figura 15B muestra la presencia de fragmentos amplificados correspondientes a dos ARNm específicos de macho (se observan trazas en el seudomacho #4). Los controles negativos de todas las RT-PCR (véase Materiales y métodos, apartado 2.1.10) no produjeron ninguna amplificación (datos no mostrados). Estos resultados indican que la falta de función *tra-2* hace que la regulación del procesamiento del pre-ARNm de *tra* sea del tipo masculino. Esto demuestra que la proteína Tra2 se requiere para la determinación sexual en *Anastrepha* a través de su participación en el procesamiento tipo hembra del transcrito primario del gen *tra*.

Para analizar el procesamiento alternativo del transcrito primario de *dsx* se procedió de la misma manera que para *tra*. En las reacciones de PCR se usó un cebador común, "dsxAo26" (Figura 16A), diseñado a partir de la secuencia del exón 2 (común a ambos sexos) y dos cebadores específicos, para amplificar, respectivamente, *dsx^M* y *dsx^F*. Los cebadores específicos fueron "dsxAo35M", correspondiente a una secuencia del exón específico de macho, y "dsxAo32F", diseñado a partir de la secuencia del exón específico de hembra (Figura 16A).

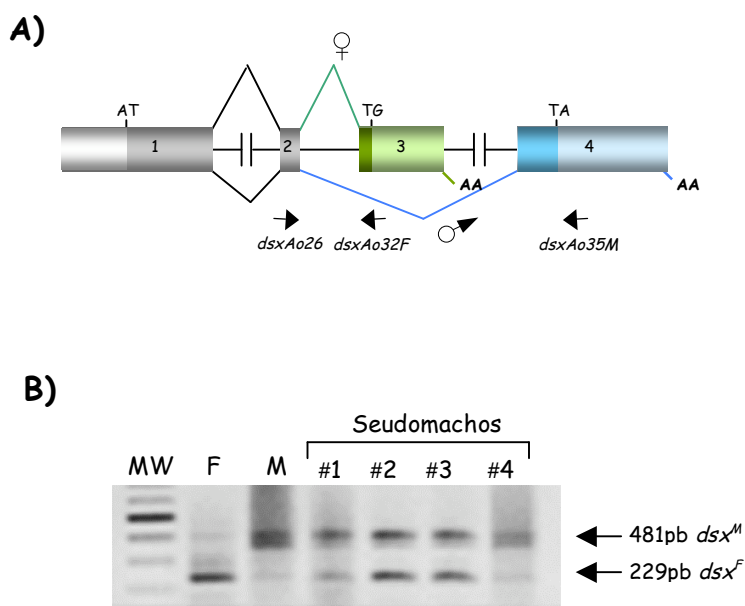


Figura 16. Análisis del procesamiento del transcrito primario del gen *dsx* de seudomachos de *A. aff. fraterculus* sp. 1. (A) Organización molecular del gen *dsx*. Los exones se representan con rectángulos y los intrones con líneas. Las líneas oblicuas representan el procesamiento alternativo del transcrito primario en hembra (arriba) y en macho (abajo). Se indica la localización de los cebadores "dsxAo26", "dsxAo32F" y "dsxAo35M" utilizados. (B) RT-PCR sobre ARN total de hembra normal (F); macho normal (M) y seudomachos (#1, #2, #3, #4). Se indica el tamaño del fragmento correspondiente a las isoformas de macho (*dsx^M*) y hembra (*dsx^F*) amplificadas. MW hace referencia al marcador de peso molecular.

Los cuatro seudomachos XX tenían los fragmentos esperados de 481 y 229 pb, correspondientes a los ARNm dsx^M y dsx^F , respectivamente (Figura 16B). La cantidad del fragmento de 229 pb variaba entre los seudomachos. Los controles negativos en todos los RT-PCR (ver Materiales y métodos) no produjeron ninguna amplificación (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que la expresión de *tra-2* en *Anastrepha* se requiere para el procesamiento tipo hembra del transcrito primario del gen *dsx*, el cual es el responsable directo del dimorfismo sexual de estos insectos.

VI. Discusión

En este trabajo de tesis doctoral se presenta el aislamiento y la caracterización en *A. obliqua* del ortólogo del gen *tra-2* (*Aotra-2*), el cual está involucrado en la determinación sexual de dípteros como *Drosophila*, *Ceratitis*, *Musca* y *Lucillia*.

El gen *Aotra-2* produce un único ARNm en ambos sexos codificando una proteína de 249 aminoácidos, la cual muestra las características de la familia de proteínas SR. Al contrario de lo que ocurre en *Drosophila*, no se detecta ningún otro ARNm específico en la línea germinal de los machos. El gen *Aotra-2* se expresa durante todo el desarrollo y la vida adulta de machos y hembras así como en los ovarios adultos, lo que indica que dicho gen podría poseer una expresión materna. La inyección del dsARN de *Aotra-2* en huevos de *Anastrepha* causa un cambio en el procesamiento de los transcritos primarios de los genes *tra* y *dsx* en los embriones de constitución cromosómica XX. Dichos transcritos primarios seguirán el esquema de procesamiento específico de macho, a pesar de que la constitución cromosómica del embrión sea XX. Estos último embriones, en consecuencias, se desarrollan como seudomachos.

El hecho de que dichos seudomachos (XX) estén compuestos por una mezcla de estructuras genitales internas de macho y de hembra indica que la transformación inducida por el dsARN *Aotra-2* es parcial. Este resultado concuerda con la observación de transformación sexual parcial inducida por el dsARN del gen *tra* en *C. capitata* (Pane *et al.*, 2002), en *B. oleae* (Lagos *et al.*, 2007), en *L. cuprina* (Concha y Scott, 2009) y en *M. domestica* (Hediger *et al.*, 2010). Estos resultados también concuerdan con la transformación sexual parcial observada por la inyección del dsARN del gen *tra-2* en *M. domestica* (Burkhardt *et al.*, 2005) y en *C. capitata* (Salvemini *et al.*, 2009). Parte de los seudomachos (XX) procedentes de estos últimos experimentos muestran, por ejemplo, poseen la terminalia de macho junto con estructuras típicas de hembra en la región anterior del cuerpo. En las especies de *Anastrepha*, incluyendo *A. aff. fraterculus* sp. 1, el grado de mosaicismo morfológico sexual solamente puede ser definido para la terminalia, (compuesta por la genitalia externa e interna) y por la analia, pues son éstas las únicas regiones morfológicas que presentan dimorfismo sexual en *Anastrepha* (Whire y Elson-Harris, 1992). Basándonos en los resultados encontrados en *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Lucilia* y *Musca*, se puede prever que la transformación sexual de hembra a seudomacho en *Anastrepha*, inducida por la inyección del dsARN *Aotra-2*, lleve a la formación de individuos que presentan una cierta variabilidad fenotípica. Aunque los seudomachos (XX) de *Anastrepha* mostraban, inequívocamente, la terminalia externa de un macho normal XY, otras regiones del cuerpo presentaban características de hembra cuando el dsARN inyectado no afectaba a las células precursoras de esas regiones. Esto explicaría el hecho de que los seudomachos de *Anastrepha* tuviesen los ARNm *tra* y *dsx* de hembra, además de los ARNm *tra* y *dsxM* de macho. La cantidad variable de estos transcritos entre los

seudomachos (XX) tendría como consecuencia la formación de estructuras típicas de hembra en las regiones de esos pseudomachos que no presentan dimorfismo sexual.

Todos estos resultados demuestran que la proteína Tra2 es necesaria para la determinación sexual en *Anastrepha*.

1. Función de la proteína Transformer2 en la determinación sexual de *Anastrepha*

En los tefrítidos *C. capitata* (Pane *et al.*, 2002), *B. oleae* (Lagos *et al.*, 2007) y en doce especies de *Anastrepha* (Ruiz *et al.*, 2007a), el gen *tra* actúa como la memoria celular para el desarrollo sexual, mediante su autorregulación positiva. Esto ocurre gracias a la participación de la proteína Tra en el control del procesamiento de su propio transcrito primario (Pane *et al.*, 2002; Lagos *et al.*, 2007). Por otro lado, también el gen *tra-2* de *C. capitata* se requiere para el procesamiento de los transcritos primarios de los genes *tra* y *dsx* (Salvemini *et al.*, 2009). Las proteínas Tra y Tra2 forman un complejo, el cual interacciona con secuencias específicas presentes en estas moléculas de ARN (Pane *et al.*, 2002; Saccone *et al.*, 2008), haciendo que la cascada de determinación sexual se dirija hacia la ruta específica de hembra. Resultados descritos en esta tesis demuestran que, también en *Anastrepha*, el gen *tra-2* juega el mismo papel en la determinación sexual de estas especies.

La expresión materna de *tra* (Pane *et al.*, 2002; Lagos *et al.*, 2007; Ruiz *et al.*, 2007a) y de *tra-2* (Salvemini *et al.*, 2009; esta tesis doctoral) en los tefrítidos sule al embrión con producto materno Tra-Tra2. Este complejo es esencial para que el procesamiento del primer pre-ARNm cigótico del gen *tra* sea de tipo hembra, de modo que se produzca la primera proteína Tra cigótica funcional. Se establece así la autorregulación positiva del gen *tra* cigótico que determina que el embrión siga el desarrollo sexual de hembra (Figura 17). En los embriones XY, sin embargo, la probable presencia del aún desconocido factor M de masculinidad en el cromosoma Y impediría que se estableciese la autorregulación positiva del gen *tra* cigótico. Consecuentemente, estos embriones no producirían proteína Tra funcional y se desarrollarían como machos (Figura 17).

La existencia del factor M en el cromosoma Y ha sido demostrada solamente en *C. capitata* (Willhoeft y Franz 1996). No obstante, la caracterización del gen *tra* en *Bactrocera* (Lagos *et al.*, 2007) y de *tra* (Ruiz *et al.*, 2007a) y *tra2* (esta tesis doctoral) en *Anastrepha* sugiere que también esos tefrítidos podrían portar el factor M de masculinidad en el cromosoma Y.

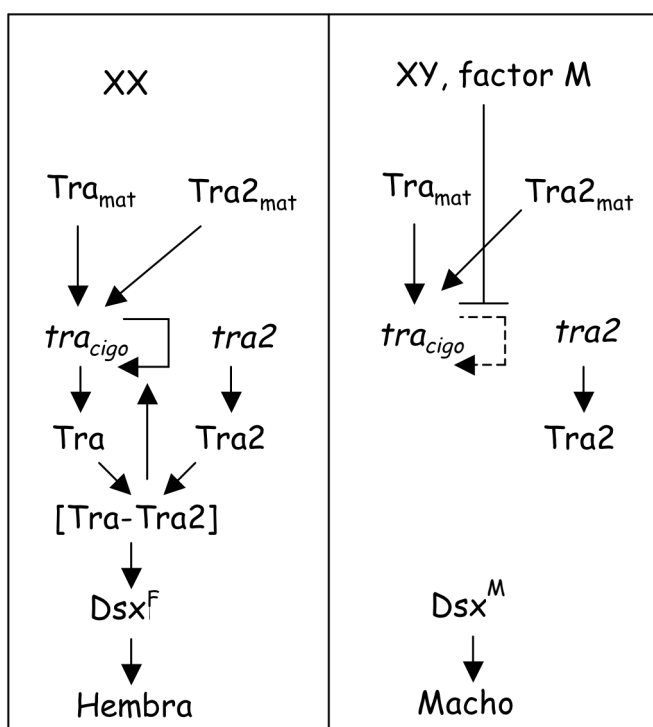


Figura 17. Cascada genética de la determinación sexual de los tefrítidos. Tra_{mat} y Tra2_{mat} se refieren a las proteínas de origen materno, mientras que Tra y Tra2 se refieren a las proteínas cigóticas. Dsx^F y Dsx^M, corresponden a las proteínas Dsx de hembra y macho, respectivamente.

Las proteínas Tra y Tra2 de los tefrítidos muestran una dualidad de función en la determinación sexual de estas especies. Por un lado, ambas proteínas se comportan como activadores del procesamiento del pre-ARNm del gen *dsx*. La unión del complejo Tra-Tra2 a sus secuencias diana, localizadas en el exón específico de hembra, activa un sitio débil del procesamiento, promoviendo así la inclusión de este exón en el ARNm que codifica la proteína Dsx^F de hembra. Por otro lado, Tra y Tra2 actúan como inhibidores del procesamiento del pre-ARNm del gen *tra*. La unión del complejo Tra-Tra2 a los exones específicos de macho inhibe la actividad de sus sitios de procesamiento, impidiendo así que dichos exones se incorporen al ARNm que codifica la proteína Tra funcional. Se ha propuesto que las secuencias ISS de unión de la proteína Tra2, encontradas en la región reguladora del procesamiento del pre-ARNm de *tra* y no en el pre-ARNm de *dsx*, constituyen la señal para la dualidad de función del complejo Tra-Tra2 en la determinación sexual de los tefrítidos (Ruiz *et al.*, 2007a).

La función descrita para los genes *tra* y *tra-2* en la determinación sexual no es exclusiva de los tefrítidos (Diptera, Tephritidae), puesto que los genes homólogos en *L. cuprina* (Diptera, Calliphoridae) parecen ejercer la misma función (Concha y Scott,

2009). Una situación similar se describió en *M. domestica* (Diptera, Muscidae), donde el gen *F* juega el papel central de la determinación sexual en esta especie. El gen *F* presenta autorregulación positiva, requiriéndose su producto materno para el establecimiento de dicha autorregulación en el cigoto (Dübendorfer y Hediger, 1998). La función del gen *tra-2* también es imprescindible para la autorregulación del gen *F* en el cigoto (Burkhardt *et al.*, 2005). Recientemente, se ha demostrado que el gen *F* es el ortólogo del gen *tra* en *Musca* (Hediger *et al.*, 2010).

El factor M de masculinidad se encuentra localizado en el cromosoma Y de *Lucilia* (Bedo y Foster, 1985), al igual que en *Musca* (Hiroyoshi, 1964; Hediger *et al.*, 1998), aunque algunas poblaciones de esta última especie lleven dicho factor M en los autosomas (Dübendorfer *et al.* 2002).

Todos estos resultados apoyan el modelo de Wilkins (1995) que propone que las cascadas formadas por los genes de la determinación sexual han evolucionado de "abajo hacia arriba". Por otro lado, dichos resultados apoyan también la propuesta de que la autorregulación de *tra* y la relación $tra-tra2 > dsx$ (respectivamente el penúltimo y último elemento de la jerarquía genética en los linajes filogenéticos Tephritidae, Calliphoridae y Muscidae) probablemente representen el estado ancestral (existente) de la actual cascada genética (también existente) en el linaje Drosophilidae. En este último linaje, *tra* es un elemento más de la cascada, la cual está regulada por el gen *Sxl* (Figura 18). Así, en el linaje filogenético que dio lugar a los drosofilidos, la evolución reclutó al gen *Sxl*, modificándolo y convirtiéndolo en el gen clave que controla la determinación sexual en *Drosophila* (Figura 18).

El control del procesamiento alternativo de los transcritos primarios de los genes *tra* y *tra-2* de los tefritidos está permitiendo desarrollar metodologías orientadas al control de plagas a través de la muerte selectiva de hembras (Fu *et al.*, 2006). En los cultivos especializados, se está usando la técnica SIT (Sterile Insect Technique) para esterilizar estos insectos. El paso siguiente consistiría en la liberación selectiva de machos estériles y no de hembras que, aunque estériles, dañarían los frutos.

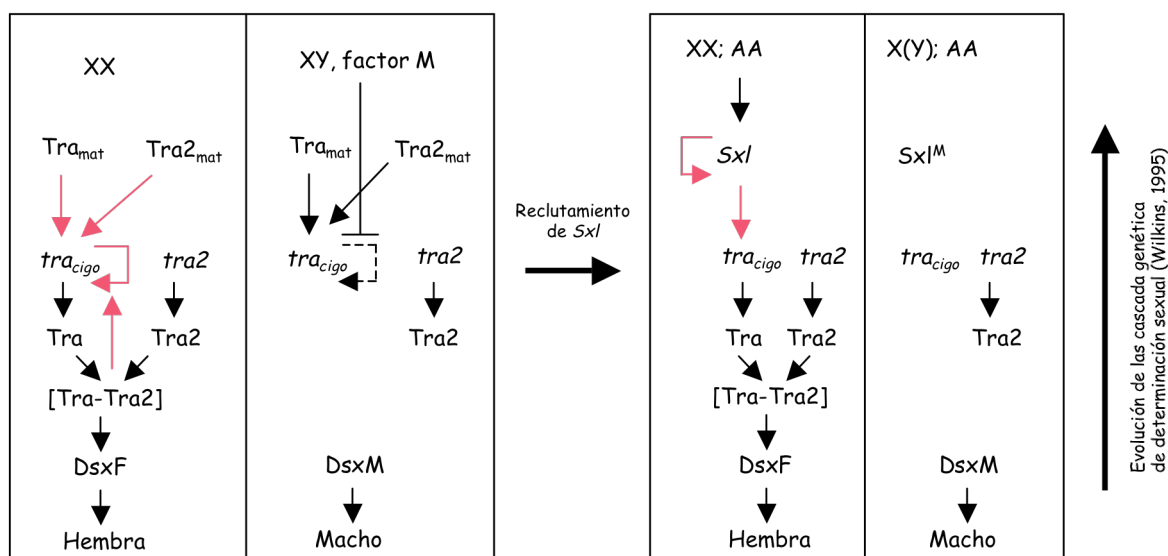


Figura 18. Evolución putativa de la cascada genética de la determinación sexual en los dípteros de las Familias Tephritidae, Muscidae, Calliphoridae y Drosophilidae. Para los símbolos ver las leyendas de las Figuras 1 y 17. Las flechas en rojo indican las diferencias entre la cascada genética de Tephritidae, Muscidae y Calliphoridae, considerada ancestral con respecto a la cascada genética más evolucionada de Drosophilidae.

2. Diferencias en la regulación del gen *transformer-2*, entre *Drosophila* y *Anastrepha*

En *Drosophila*, el gen *tra-2* presenta también una dualidad de función. Éste se comporta como un activador del procesamiento de los pre-ARNm de los genes *dsx* y *fru* en el soma de las hembras y como un inhibidor del procesamiento de su propio transcrito primario en la espermatogénesis del macho adulto. Durante este proceso, un aumento no fisiológico de los niveles de proteína Tra2 hace que esta misma proteína se una a secuencias específicas (ISS) presentes en su propio transcrito primario, a nivel del intrón M1, provocando la retención de dicho intrón. Este intrón M1 es portador de codones de parada de la traducción, lo que determina que el ARNm correspondiente produzca una proteína Tra2 truncada, no funcional (Figura 4) (Mattox *et al.*, 1990). De esta manera, se regulan los niveles de proteína Tra2 funcional en el testículo, pues altos niveles de esta proteína causan esterilidad del macho (McGuffin *et al.*, 1998) y letalidad de machos y hembras (Qi *et al.*, 2006). Esta autorregulación negativa de *tra-2* se da en la línea germinal del macho y no en el soma de los machos y las hembras (Mattox *et al.*, 1990). Se ha observado, sin embargo, que también las células somáticas de *Drosophila* pueden producir ARNm conteniendo el intrón M1, siempre y cuando se expresen elevados niveles de proteína Tra2 funcional (Qi *et al.*, 2006). Estos datos indican que la autorregulación negativa de *tra2* es dependiente de los niveles de proteína Tra2 funcional y no de la existencia de factores específicos de

las células germinales del macho que controlen el procesamiento del pre-ARNm de *tra-2*. La diferencia entre células somáticas y células germinales masculinas, con respecto a la autorregulación negativa de *tra-2*, reside en el hecho de que la expresión de este gen en las células germinales masculinas es alrededor de 14 veces mayor que en las células somáticas (Qi *et al.*, 2006). El transcrito primario de *tra-2* en la línea germinal del macho proviene de un promotor que funciona específicamente en estas células. Esta autorregulación negativa de *tra-2* se observa también en *D. virilis* (Chandler *et al.*, 1997).

En *Anastrepha*, el gen *tra-2* produce un único ARNm en el soma de ambos sexos, mientras en el testículo del macho adulto expresa también un ARNm portador del intrón 3 que se correspondería con el intrón M1 de *Drosophila*. Sin embargo, los niveles de este último ARNm parecen ser muy bajos (Figura 11) respecto a los niveles del transcrito que lleva el M1 presentes en los testículos de *Drosophila*. En *D. melanogaster*, el ARNm portador del intrón M1 representa alrededor del 50% del total de ARNm expresado por el gen *tra-2* (Mattox and Baker, 1991). Por otro lado, al contrario de lo que ocurre en *Drosophila*, donde el transcrito *tra2-179* proviene de un promotor que funciona específicamente en la línea germinal del macho (Mattox *et al.* 1990), los dos transcritos en *Anastrepha* provienen de un único promotor, el cual funciona tanto en el soma como en los testículos.

El gen *tra-2* produce un único ARNm en ambos sexos en *C. capitata* (Salvemini *et al.*, 2009), en *M. domestica* (Burkgardt *et al.*, 2005) y en *L. cuprina* (Concha y Scott, 2009), también en los testículos de los adultos.

Todos estos resultados sugieren que el único promotor del gen *tra-2* en los dípteros *Anastrepha*, *Ceratitis*, *Musca* y *Lucilia* funcionaría al mismo nivel en las células somáticas y en las células germinales del macho. Esto hace suponer que la función de la autorregulación negativa del gen *tra-2*, *Drosophila* la habría adquirido durante el linaje evolutivo que dio lugar a los drosofilidos. Esta nueva función constituiría una solución evolutiva como respuesta a la mayor expresión de *tra-2* que aparecería específicamente en la línea germinal del macho, debida a la adquisición de un promotor específico de dicha línea germinal (Figura 4). La proteína Tra2 pertenece a la familia de proteínas SR involucradas en funciones básicas de la célula, tales como: el procesamiento de los transcritos primarios, el transporte de los ARNm y su traducción (Shepard y Hertel, 2009). Por lo tanto, los niveles de estas proteínas tienen que estar regulados.

3. Evolución molecular de la proteína Transformer2

El grado de similitud entre las proteínas Tra2 sigue parcialmente las relaciones filogenéticas de las especies comparadas. Por ejemplo: la similitud de las proteínas Tra2 es mayor entre los dípteros que entre éstos y los lepidópteros e himenópteros (Tablas 4 A y B). Dentro de los dípteros, el mayor porcentaje de similitud se encuentra entre las proteínas Tra2 de las especies del género *Anastrepha* (Tabla 4A) que entre estas especies y *Ceratitis* y *Bactrocera*, otros dos géneros de la familia Tephritidae. Igualmente, las proteínas Tra2 pertenecientes a los tefrítidos son más similares entre sí que entre ellas y las pertenecientes a las otras familias: Muscidae (*Musca*), Calliphoridae (*Lucilia*) y Drosophilidae (*Drosophila*). Sin embargo, la similitud entre las proteínas Tra2 de los tefrítidos que pertenecen al subgrupo Acalyptratae y las de *Musca* y *Lucilia* que pertenecen a otro subgrupo, Calyptratae, es mayor que la similitud entre las proteínas Tra2 de los tefrítidos y las de los drosofilidos, las cuales pertenecen también al subgrupo Acalyptratae (Figura 4B). Al contrario, la comparación entre las proteínas Dsx de todas estas especies y familias concorda con la relación filogenética que hay entre ellas. Las proteínas Dsx de los tefrítidos son más similares a las de *Drosophila* que a las de *Musca* (Ruiz *et al.*, 2007b). Estos resultados están de acuerdo con resultados previos sobre la evolución de los otros genes de la determinación sexual en los dípteros: *Sxl* (Serna *et al.*, 2004), *tra* (Ruiz *et al.*, 2007a) y *tra-2* (Gomulski *et al.*, 2008; Concha y Scott, 2009; esta tesis doctoral). Esta discrepancia puede ser explicada por la posición de estos genes en la cascada genética de la determinación sexual. El gen *dsx* es el gen más basal (ancestral) de esta cascada, mientras que los otros genes habrían sido reclutados a lo largo de la evolución de los distintos linajes filogenéticos (Figura 18). Ésta es la razón por la que se espera un grado mayor de conservación para *dsx* que para los otros genes (Wilkins, 1995). Por otro lado, las proteínas Dsx son factores de transcripción que controlan los genes de cito-diferenciación sexual. Estas proteínas son las directas responsables de la formación de las estructuras de dimorfismo sexual en ambos sexos durante el desarrollo sexual. Esto hace que las proteínas Dsx estén sometidas a una fuerte selección purificadora para mantener este control. Las proteínas Tra y Tra2 pertenecen a la familia de proteínas SR, las cuales se caracterizan por poseer dominios RS (formados por dipéptidos arginina-serina). El número de dipéptidos de estos dominios es variable (Tablas 9A y B) entre las proteínas SR, siempre y cuando se mantenga un número mínimo que les permita ejercer su función (McAllister y McVean, 2000).

La comparación de las proteínas Tra2 de *Anastrepha* con las de otros insectos indica que el dominio RRM y la región "linker" son las regiones más conservadas (Tabla 7 y 8) en contraste con la diversidad mostrada en los dominios RS1 y RS2 (Tablas 5 y 6). Esto está de acuerdo con el hecho de que la región RRM-linker juega un papel esencial

en la función de las proteínas Tra2. Dicha región está considerada como un motivo que identifica a las proteínas Tra2 frente a otras proteínas SR (Dauwalder *et al.*, 1996). En este contexto, hay que mencionar que dos de las tres mutaciones de falta de función en el gen *tra-2* de *Drosophila*, las cuales afectan tanto la determinación sexual como la espermatogénesis, se localizan en la región RRM-linker (Amrein *et al.*, 1994). Por otro lado, el dominio RRM confiere a la proteína Tra2 su capacidad de unión al ARN. Un ejemplo paradigmático de la función de Tra2 como elemento de unión al ARN es su interacción con la proteína Tra para formar el complejo Tra-Tra2 que controla el procesamiento del pre-ARNm del gen *dsx*. La proteína Tra2 es la que confiere a dicho complejo su capacidad de unión a ese pre-ARNm. La proteína Tra, la que juega el papel discriminatorio central del desarrollo sexual del cigoto, carece de dominio de unión al ARN.

Ruiz y Sánchez, en 2010, observaron experimentalmente una menor eficiencia del complejo formado por Tra de *Anastrepha* y Tra2 de *Drosophila* con respecto al complejo formado por las propias proteínas Tra y Tra2 de *Drosophila*, en el control del procesamiento del pre-ARNm de *dsx* de *Drosophila*. Este hecho se explica por el alto grado de divergencia entre los dominios RS de las proteínas Tra2 de *Anastrepha* y de *Drosophila*. La interacción entre Tra de *Drosophila* y Tra2 de *Anastrepha* estaría afectada por los cambios acumulados en los dominios RS de estas proteínas ocurridos después de la separación de los linajes filogenéticos de los tefrítidos y de los drosofilidos. Todos estos resultados sugieren que las proteínas Tra y Tra2 han co-evolucionado para ejercer su función en la determinación sexual.

VII. Conclusiones

- 1.** Se ha aislado y caracterizado el gen *tra-2* de *A. obliqua* y de otras 10 especies de *Anastrepha*.
- 2.** El gen *tra-2* se expresa de forma constitutiva en ambos sexos, en todos los estadios del desarrollo y la vida adulta. Su expresión en los ovarios adultos indicaría que *tra-2* tiene un efecto materno en el desarrollo sexual.
- 3.** El gen *tra-2* produce un único ARNm que codifica una proteína Tra2 de 249 aminoácidos, la cual presenta las características de las proteínas SR. Éstas son: un dominio RRM de unión al ARN y dos dominios RS ricos en dipéptidos de arginina-serina.
- 4.** El gen *tra-2* forma parte de la cascada de genes de la determinación sexual en *Anastrepha*, participando, junto con *tra*, en el control del procesamiento del transcrito primario de los genes *dsx* y *tra*. Por lo tanto, el gen *tra-2* de *Anastrepha* es necesario para la autorregulación positiva del gen *tra*.
- 5.** El gen *tra-2* de *Anastrepha* no parece poseer la función autorreguladora negativa específica de la línea germinal del macho mostrada por el ortólogo *tra-2* de *Drosophila*. Se propone que dicha función aparecería en el linaje que dio lugar a los drosófilidos.
- 6.** La comparación de la proteína Tra2 de *Anastrepha* con la de otros insectos evidencia que el mayor grado de conservación ocurre en el dominio RRM y en la región "linker", mientras que los dominios RS1 y RS2 presentan variabilidad en cuanto al número de aminoácidos que los componen, como al número de dipéptidos arginina-serina que poseen.
- 7.** Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral corroboran la hipótesis que propone que el mecanismo de determinación sexual de los tefrítidos constituiría el mecanismo ancestral con respecto al que se existe en insectos más evolucionados como son los drosófilidos.

VIII. Bibliografía

ALUJA, M. (1994). Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annu Rev Entomol* 39:155-178

AMREIN, H., MANIATIS, T., NÖTHINGER, R. (1990). Alternative spliced transcripts of the sex determining gene *tra-2* of *Drosophila* encode functional proteins of different size. *EMBO J.* 9:3619-3629.

AMREIN, H., HEDLEY, ML., MANIATIS, T. (1994). The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2. *Cell.* 76(4):735-746.

BELOTE, J.M. and BAKER, B.S. (1983). The dual function of a sex determining gene in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 95:512-517.

BERG, G.H. (1979). Pictorial key to fruit fly larvae of the family Tephritidae. *San Salvador: Organ. Internac. Reg. Sanidad. Agropec.* 36p.

BEYE, M., HASSELMANN, M., KIM FODRK, M., PAGE, R.E. Jr. AND OMHOLT, S.S. (2003). The gene *csd* the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114:419-429.

BLACK, DL. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291-336.

BOGGS, R.T., GREGOR, P., IDRIS, S., BELOTE, J.M. AND MCKEOWN, M., (1987). Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. *Cell* 50(5): 739-747.

BULL, J.B. (1983). Evolution of sex determining mechanisms. *The Benjamín/Cummings publishing Company, Inc, menlo Park, California. USA.*

BURGHARDT, G., HEDIGER, M., SIEGENTHALER, C., MOSER, M., DÜBENDORFER, A., BOPP, D. (2005). The *transformer2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Dev Genes Evol.* 215:165-176.

BURTIS, KC., BAKER, BS., (1989). *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell.* 56(6): 997-1010.

CHANDLER, D., MCGUFFIN, M.E., PISKUR, J., YAO, J., BAKER, B.S., MATTOX, W. (1997). Evolutionary conservation of regulatory strategies for sex determination factor *transformer-2*. *Mol Cell Biol* 17(5):2908-2919.

CLINE, TW. (1993). The *Drosophila* sex determination signal: how to flies count to two? *Trends Genet* 9(11): 385-390. Review.

CONCHA, C., SCOTT, MJ. (2009). Sexual development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) is controlled by the *transformer* gene. *Genetics* 182:785-789.

DAUWALDER, B., AMAYA-MANZANARES, F., MATTOX, W. (1996). A human homologue of the *Drosophila* sex determination factor Transformer-2 has conserved splicing regulatory functions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:9004-9009.

DÜBENDORFER, A., HEDIGER, M. (1998). The female-determining gene *F* of the housefly, *Musca domestica*, acts maternally to regulate its own zygotic activity. *Genetics* 150:221-226.

DÜBENDORFER, A., HEDIGER, M., BURGHARDT, G., BOPP, D. (2002). *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol* 46:75-79.

ERICKSON, JW., QUINTERO, JJ. (2007). Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol* (12):e332.

FU, G., CONDON, KC., EPTON, MJ., GONG, P., JIN, LI, CONDON, GC., MORRISON, NI., DAFA'ALLA, TH., ALPHEY, L. (2010). Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. *Nature Biotechnology* (25) 3:353-357.

GODAY, C., SELIVON, D., PERONDINI, ALP., GRECIANO, PG., RUIZ, MF. (2006). Cytological characterization of sex chromosomes and ribosomal DNA location in *Anastrepha* species (Diptera, Tephritidae). *Cytogenet Genome Res* 114:70-76.

GOMULSKI, LM., DIMOPOULOS, G., XI, Z., SOARES, MB., BONALDO, MF., MALACRIDA, AR., GASPERI, G. (2008). Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genomics* 9:243.

GORALSKI, TJ., EDSTRÖM, JE., BAKER, BS. (1989). The sex determination locus *transformer-2* of *Drosophila* encodes a polypeptide with similarity to RNA binding proteins. *Cell* 56(6):1011-1018.

HALL, JC. (1994). The mating of a fly. *Science* 264(5166):1702-1714.

HAZELRIGG, T. and TU, C. (1994). Sex-specific processing of the *Drosophila exuperantia* transcript is regulated in male germ cells by the *tra-2* gene. *Proc. Acad. Sci. USA*. 91:10752-10756.

HEDIGER, M., MINET, AD., NIESSEN, M., SCHMIDT, R., HILFIKER-KLEINER, D., CAKIR, S., NÖTHIGER, R., DÜBENDORFER, A. (1998). The male-determining activity on the Y chromosome of the housefly *Musca domestica*, consists of separable elements. *Genetics* 150(2):651-61.

HEDIGER, M., HENGGELER, C., MEIER, N., PEREZ, R., SACCONI, G., BOPP, D. (2010). Molecular characterization of the key switch *F* provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics* 184(1):155-170.

HEINRICH, V., RYNER, L.C., BAKER, B.S. (1998). Regulation of sex-specific selection of *fruitless* 5' splice sites by *transformer* and *transformer-2*. *Mol Cell Biol* 18(1): 450-8.

HIROYOSHI, T. (1964). Sex-limited inheritance and abnormal sex ratio in strains of the housefly. *Genetics* 50:373-385.

HOSHIIJIMA, K., INOUE, K., HIGUCHI, I., SAKAMOTO, H., SHIMURA, Y. (1991). Control of *doublesex* alternative splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science* 252: 833-836.

KENNERDELL, JR., CARTHEW, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* 95(7):1017-26.

KULATHINAL, R.J., SKWAREK, L., MORTON, R.A., SINGH, R.S. (2003). Rapid evolution of the sex determining gene, *transformer*: Structural diversity and rate heterogeneity among sibling species of *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 20:441-452.

LAGOS, D., KOUKIDOU, M., SAVAKIS, C., KOMITOPOULOU, K. (2007). The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Molecular Biology* 16:221-230.

LAGOS, D., RUIZ, M.F., SÁNCHEZ, L., 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* 348:111-21.

MADIGAN, S.J., EDEEN, P., ESNAYRA, J., MCKEOWN, M. (1996). *att*, a target for regulation by *tra2* in the testes of *Drosophila melanogaster*, encodes alternative RNAs and alternative proteins. *Mol Cell Biol* 16(8):4222-4230.

MANIATIS, T., FRISTSCH, EF. AND SAMBROOK, J. (1982). Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring harbour laboratory press, cold Spring Harbour, NY.

MATTOX, W., MCGUFFIN, ME., BAKER, BS. (1996). A negative feedback mechanism revealed by functional analysis of the alternative isoforms of the *Drosophila* splicing regulator transformer-2. *Genetics* 1996, 143:303-314.

MATTOX, W., AND BAKER, BS. (1991). Autoregulation of the splicing of transcripts from the transformer-2 gene of *Drosophila*. *Genes Dev.* 5:786-796.

MATTOX, W., PALMER, MJ. AND BAKER, BS. (1990). Alternative splicing of the sex determination gene transformer-2 is sex-specific in the germ line but not in the soma. *Genes Dev.* 5:789-805.

MCALLISTER, BF., MCVEAN, GA. (2000). Neutral evolution of the sex-determining gene transformer in *Drosophila*. *Genetics* 154(4):1711-20.

MCGUFFIN, ME., CHANDLER, D., SOMAIYA, D., DAUWALDER, B., MATTOX, W. (1998). Autorregulation of transformer-2 alternative splicing is necessary for normal male fertility in *Drosophila*. *Genetics* 149(3):1477-1486.

NORROBOM AL., ZUCCHI, RA., HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. (1999). Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (*Trypetinae: Toxotrypanini*): based on morphology. In *Aluja, M., Norrobom, A.L., eds. Fruit Flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behaviour. Boca Ratón: CRC Press. Pp. 299-342.*

NORROBOM, AL. (2002). A revision of the *Anastrepha serpentina* species group (Diptera: Tephritidae). *Proc Entomol Soc Was* 104:390-381.

PANE, A., SALVEMINI, M., DELLI BOVI, P., POLITO, C., SACCONI, G. (2002). The *transformer* gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* 129:3715-3725.

POMIANKOWSKI, A., NÖTHIGER, R., WILKINS, A. (2004). The evolution of the *Drosophila* sex determination pathway. *Genetics* 166: 1761-1773.

QI, J., SU, S., MATTOX, W. (2007). The *doublesex* splicing enhancer components Tra and RBP1 also repress splicing through an intronic silencer. *Mol Cell Biol* 27:699-708.

QI, J., SU, S., MCGUFFIN, ME., MATTOX, W. (2006). Concentration dependent selection of targets by an SR splicing regulator results in tissue-specific RNA processing. *Nucl Acids Res* 34:6256-6263.

RUBIN, GM., SPRADLING, AC. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218(4570):348-353.

RUIZ, MF., STEFANI, RN., MASCARENHAS, RO., PERONDINI, AL., SELIVON, D., SÁNCHEZ, L. (2005) The gene *doublesex* of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics* 171(2):849-54.

RUIZ, MF., EIRÍN-LÓPEZ, JM., STEFANI, R., PERONDINI, ALP., SELIVON, D., SÁNCHEZ, L. (2007). The gene *doublesex* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *Dev Genes Evol* 217:725-731.

RUIZ, MF., MILANO, A., SALVEMINI, M., EIRÍN-LÓPEZ, JM., PERONDINI, ALP., SELIVON, D., POLITO, LC., SACCONI, G., SÁNCHEZ, L. (2007a). The gene *transformer* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS ONE* 2:e1239.

RYNER, LC., GOODWIN, SF., CASTRILLON, DH., ANAD, A., VILLELLA, A., BAKER, BS., HALL, JC., TAYLOR, BJ., WASSERMAN, SA. (1996). Control of male sexual

behaviour and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell* 87(6): 1079-89.

SACCONI, G., PELUSO, I., ARTIACO, D., GIORDANO, E., BOPP, D., POLITO, LC. (1998). The *ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. *Development* 125(8):1495-1500.

SACCONI, G., SALVEMINI, M., PANE, A., POLITO, LC. (2008). Masculinization of XX *Drosophila* transgenic flies expressing the *Ceratitis capitata* Doublesex M isoform. *Int J Dev Biol* 52(8):1051-1057.

SALVEMINI, M., ROBERTSON, M., ARONSON, B., ATKINSON, P., POLITO, C., SACCONI, G. (2009). *Ceratitis 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., FRISTSCH, E.F., MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY*.

SANCHÉZ, L., GORFINKIEL, N. AND GUERRERO, I. (2005). Sex determination and development of the genital disc. In *Comprehensive molecular Insect Science*, vol. 1 GILBERT, L.I., IATROU, K. AND GILL, S.S. (eds), *ElsevierPergamonOxford, UK*, pp. 1-38.

SÁNCHEZ, L. (2008). Sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol*. 52(7): 837-856.

SEÍN F. Jr. (1933). *Anastrepha* fruit fly in Puerto Rico. *Puerto Rico Department of Agricultura Journal* 17:183-196.

SELIVÓN, D., VRETOS, C., FONTES, L., PERONDINI ALP. (2004). New variant form in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae), pp. 253-258. *Proc. VI*

Intern Symp. Fruit Flies Economic Importance, edited by Barnes, Isteg Scientific Pub, Irene, South Africa.

SELIVON, D., PERONDINI, ALP. (1997). Evaluation of techniques for C and ASG banding of the mitotic chromosomes of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Brazil J Genet* 20:651-654.

SELIVÓN, D., PERONDINI ALP., MORGANTE, JS. (2005**a**). A genetic-morphological characterization of two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera : Tephritidae). *Ann Entomol Soc Amer* 98:365-381.

SELIVON, D., PERONDINI, ALP., ROCHA, LS. (2005**b**). The mitotic chromosomes of eight species of *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae). *Neotrop Entomol* 34:273-279.

SERNA E, GORAB E, RUIZ MF, GODAY C, EIRÍN-LÓPEZ JM, SÁNCHEZ L (2004). The gene *sex-lethal* of the *Sciaridae* family (Order Diptera, Suborder Nematocera) and its phylogeny in dipteran insects. *Genetics* 168:907-921.

SHEPARD, PJ., HERTEL, KJ. (2009). The SR protein family. *Genome Biology* 10:242.

SCHÜPBACH, T. (1982). Autosomal mutations that interfere with sex determination in somatic cells of *Drosophila* have no direct effect on the germline. 89(1):117-127.

WATANABE, TK. (1975). A new sex-transforming gene on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Japan. J. Genet.* 50:269-271.

WEEMS, HV.Jr. (1980). *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry Entomology Circular* 217:1-4.

WILKINS, A. (1995). Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays* 17:71-77.

WILLHOEFT, U., FRANZ, G. (1996). Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144(2):737-45.

WHITE, IM. ELSON-HARRIS, M. (1992). Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics, 601 pp. *International Institute of Entomology*, London.

ZUCCHI, RA. (2000) Taxonomia. In: MALAVASI, A., ZUCCHI, R.A. ET AL. (eds). *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Riberão Preto, Holos, pp. 13-24.

IX. Anexos

5' ACGCCAGGGT TTTCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT GTAATACGAC 60
TCACTATAGG GCGAATTGGG CCCGACGTCG CATGCTCCCG GCCGCCATGG CGGCCGCGGG 120
AATTCGATTC CATCCTAATA CGACTCACTA TAGGGCTCGA GGCCGCCCGG GCAGGTGCTC 180
AGAGCAAGCG GGCATTTTTA TTTCATTCAG CGGTAATTTG TGTAATAATAT CGTCGGAAGG 240
AACGAAAATA GTTTTCTGGC TATAATTAGT GAAATCCAGT TGATACGCAA ATTGAAAGAG 300
TTGGAATGGT AAGTGTAGTG ATTTAAAATT CAGAAAGCAA ACACGCTTGT ATAGACAATC 360
GACGCAGATG GCGTTCAGAC GCTTTCACA CTACCGCGCT TTGTTCTCT GCTTATATGT 420
ACTATTTAGA ATTATTTGGT ATTCAAGATA TTTAATTTGA TATGTTTAT GTTCAAACCTT 480
CTGGGAATTT AAGGGCTTTC AATATTTTTT TTTAATAGTT CAAGACCTCA ACATAACCTC 540
AAATATTTGT TCACATCCCA GGAAAAAGTT GCGAACTCGT AAATAAAGAT GTAAATTTTT 600
GTATATCTCA ATTGCAGAGT CCACGTACCC GTAGTCGTAG CATTTCCCGG CGTCGAAGTT 660
ATAGCAAATC GCCCGCGCGG CGTAGCAATG GACGTCGGTA AGTGCTAATT TCGTTTTACA 720
GTATAAGTAA STATGGCTCT ACTAACATTT ACTTCAATCT ATAGCCGGCA TTCTAGAGAA 780
AAAGTGTATA ACTCTCGAAG CCGTTCAGCC TCACGACACC TCCTTCACC ACCACCGCTA 840
CCAGCTGGAC GTGCCGGCCG TTA^{CT}CGGAT GCCAGTAAA GTTCTTCAAC GTAAGTGGGC 900
AATAAACAAA TTGAAATTTT GTTCTAAGA AATACGCCTT TTCATATTAA GATCTACGAA 960
CGCAGCTTAC TTCCAGCTTT TGAAATTATA ATTTAACTTG TTTCCGTTG CTATGGCAAC 1020
CAGTTTTTAT TTATATTGAA GTTACTAGAT TCACAAATTG CATAGATTTT CAAGTCTGCA 1080
ATAATTTTAT ACAGGGAAAA TGTATTACTT TCTAGTAAGG CATGTAAATA GGGGGCCTTA 1140
TTTTCCAGCA GAAAAAAAT TATAACCAGG TTTCACGCTT GTAAATAGCG TAATCCGAAA 1200
TGGTGTGAGC AGTAATTTTT CGTTGATGGG CACAAATAAC TTTAAGCTGT GCATTTGCCA 1260
AGTAAGTTTT CGCTAACGTG ATGGTTATTT TTTCCGTTT AGAATAGTGA AATTGTAGCA 1320
AATAACGTAT GAACTCAAT ACTGAAAAGC AAGCATACTT GCAAAGTAAG ATTTTCGAAA 1380
TTTCACACAC AGTTGAATAG AACGGAAAGA GTTCAACTT CAAACGATCG ATTAATGAAT 1440
TGAAAGAATT GAAATGTGG CAGAAACGCA AGTTTTAGCA AGTTTTTCAG CTTAGTACTA 1500
ACTTATGAAT TGATCTCGGC TTTCAATACA AAACAAAACA ACAAACACA ATACAAAAT 1560
ATCAAGTCAG TCTCAGAACC GCAAGTTTAG CAATTGAAAC ACAATTTAAC ATCTCAATCA 1620
AACTCAACTT AGAGGGAGCA AATGCACAAGA TGAAAACAG AATTC AATAC GAATAGTTCT 1680
TTTAAAAAA TTA^{ACT}CATT TATGGAAGTG TATTA^{ACT}TAC TTTCAATATT TGAATTTTTT 1740
GTTCTTTCGC ATGTCAAAG GTC^{ACT}CTCC CCACGTCATG GCCGCCGCGT TTCCCGTTCCG 1800
CGTTCACGCA GTCCATACGA TAAGCGACGT GCTAATCGCG TAAGTACAAC AACTACATA 1860
GTCAATTTAT TATTATTAAT CATAGCCTGT TATTTTTTGT CCATAGGAAA AGCCAGTGCA 1920
AAATCGCTGT ATAGGAGTTT TCGGTTTGAG TGTGTATACG ACACAGCAAA AAATACGCGA 1980

```

TATATTCTCA AGATTTGGCC CAATCGAACG AATACAAGTT GTTATTGATG CACAGGTGGG 2040
TGTACAATAA ACTGTGTTAA AGCAGAAGAT TGCCATGATA CACAACGCAT ACATTTTCAA 2100
ATTTAAACAT TTTTGTTAAT CGCATGAAAA GTGGCTAGAC TAATTCATTT GAAGTTAGAG 2160
ATTATGAGTG TCACGCCAAA GGCTCAAGCG TGAATATACT AAAGGCTCTC TAAGACATTT 2220
ACCAACCTTA CAATGAATAA TGCAAAAATT TAAATTCACA TGTCTAAAAA ATTGCACACA 2280
TTTTTTTTTAA TATTATTTAC AGACCGGCAG ATCTCGAGGA TTTTGTTTTA TTTATTATCA 2340
GGATATAGCC GATGCTAAGG CAGCTAAAGA CGCTTGCTCG GGCATGGAAA TCGATGATCG 2400
TCGTATACGT GTCGATTACT CTACAACACA ACGACCACAT ACACCTACAC CGGGTGTTTTA 2460
TATGGGGCGT TATACGCGGT ATGTACTTAT GCATGTTATG CATTGGGTAT TGTGCGTCAT 2520
TCTTAAATTT TGTTTTATTT TCATAGGCGT GAACGTGATC ATGATCGTTA TCGTGATGAT 2580
TATCGCTCCC GTCGTCGATC GGTTCAGCCC CACAACAGCC GCAATAGCTA TCGAGGAGAT 2640
CGCAGACGCC GATACGATCG CAGCCGAAGT CGTTCCTATT CACCGCGTAC GTAAATTGAA 2700
AGTGTGTGAC TATTAGAATT AAATAAAATT TATTTGTTGT TCTTTTACAG GGCGTACGCG 2760
CTATTAAAAA TATGTTCAAC ACTAAAGAAA CTTTATAATA CGATATATAT ACGGAAGCCC 2820
ACACCTTGGT AATGTAGTAA CTGTGTCGCC AAGATATCAT TACCTATTTT TTCAAATGGA 2880
CTTTTTGCTA AAATCAGGCA AAACA AAAAT TTAGAAATAT CAAGTTAGCT GCAGAACACA 2940
ACTAAAACAA AATATAACAA CATACTTTTG AATTATATTT TATTTATATT ATTGGAGTTG 3000
TGAGAGAACT GCGCTAGTGT TTTATCCGGC ATCGAGTAAT CCCATGTCAT CATCATAATT 3060
TCATCGAACC GATTAAAATT TTTTCGCAA TCATACTACA AACTGAATGT GTCTTACTCG 3120
TCAAATGCTT AATAAATGGA TGTTTCAATT CGTCACAACC AAGCACAATA CTTGATTATT 3180
TCGCCCCGAA TTGGACTTCA TTTCATTTTT CAACAATGTT TATACTCGTA TTGAAAATCT 3240
GATATTCTTT CTTATCATAT TCTATTATCT TTTGCTCACC ATTGTTACTA GCAATTAACA 3300
CATTTTATTT GTTGATTTC AAACACTTTC GTCTCACTTT GTGTTTAATA GTACATATAC 3360
ATATATAGTT GCATTGCAGT TTATAAATTT AACTGAAAA ACAAGATCAA CTAAATTTTG 3420
TGATGCAATA GCACTAGCTT TGTCTAATGT ATTATATTAC TATTTAAATG TATGCGTGCC 3480
CAGCAGAGGA TTTCAAATA CAGTGGTGGG TACGTTTCGC ACCTATTTTT ATATATTATA 3540
AAAAAATGCG AGACTTCAGC GTTTGTTTTT TTGTATGTAC TTTTAATTAG TTTAATGTT 3600
TACTAATACA AATTGAATAA AAGAAGTAAA AACAC 3'

```

Anexo 1. Secuencia genómica del gen *tra-2* de *A. obliqua*. En verde se representan los exones y en rojo los intrones. En negro se representan las regiones 5' y 3' UTR. En azul, se resalta la señal de poliadenilación: AATAA. Los recuadros indican las secuencias ISS (CAAGA), identificadas en los intrones 1 y 3.

A.obliqua ATGAGTCCACGTACCCGTAGTCGTAGCATTTC CCCCGCGTCGAAGTTATAGCAAATCGCCC
A.sp1
A.sp2
A.sp3
A.sp4
A.grandisC.....
A.serpentinaA.....
A.sororculaA.....
A.striataA.....
A.bistrigataA.....
A.amita

A.obliqua GCGCGGCGTAGCAATGGACGTCGCCGGCATTCTAGAGAAAAAGTGATATAACTCTCGAAGC
A.sp1
A.sp2T.....
A.sp3
A.sp4C.....
A.grandisT.....C.....T.....
A.serpentina
A.sororcula
A.striataG.....
A.bistrigataG.....
A.amitaC.....

A.obliqua CGTTCAGCGTCACGACACCCTCCTTACCACCACCGCTACCAGCTGGACGTGCCGGCCGT
A.sp1
A.sp2T.....
A.sp3
A.sp4C.....
A.grandisT.....C.....T.....
A.serpentinaT.....T.....
A.sororculaT.....
A.striata
A.bistrigataT.....
A.amitaC.....

A.obliqua TACTCGGATGCCAGTAAAAGTTCTTCAACGCCACTCTCCCCACGTCATGGCCGCCGCGTT
A.sp1
A.sp2G.....
A.sp3
A.sp4G.....
A.grandis
A.serpentina
A.sororcula
A.striata
A.bistrigataA.....
A.amitaG.....

A.obliqua TCCCGTTCGCGTTCACGCAGTCCATACGATAAGCGACGTGCTAATCGCGAAAAGCCAGTG
A.sp1G.....
A.sp2
A.sp3G.....
A.sp4
A.grandisA.....
A.serpentina
A.sororculaT.....
A.striataA.....
A.bistrigataC.....
A.amita

A.obliqua CAAAATCGCTGTATAGGAGTTTTTCGGTTGAGTGTGTATACGACACAGCAAAAATACGC
A.sp1G.....
A.sp2C.A.....
A.sp3G.....
A.sp4C.A.....
A.grandis
A.serpentinaG.....A.....
A.sororculaA.....
A.striataC.....
A.bistrigataC.....
A.amitaC.A.....

A.obliqua GATATATTCTCAAGATTTGGCCCAATCGAACGAATACAAGTTGTTATTGATGCACAGACC
A.sp1
A.sp2
A.sp3
A.sp4
A.grandisT.....
A.serpentina
A.sororcula
A.striataT.....
A.bistrigataT.....
A.amita

A.obliqua GGCAGATCTCGAGGATTTTGTTTTATTATTATCAGGATATAGCCGATGCTAAGGCAGCT
A.sp1
A.sp2C.....
A.sp3
A.sp4
A.grandisA.....
A.serpentina
A.sororcula
A.striataA.....
A.bistrigataA.....
A.amita

A.obliqua AAAGACGCTTGCTCGGGCACGGAAATCGATGATCGTTCGTATACGTGTCGATTACTCTACA
A.sp1T.....
A.sp2T.....
A.sp3T.....
A.sp4T.....C.....
A.grandisT.....
A.serpentinaT.....
A.sororculaT.....
A.striataT.....
A.bistrigataT.....
A.amitaT.....C.....

A.obliqua ACACAACGACCACATACACCTACACCGGGCGTTTATATGGGGCGTTATACGCGCGTGAA
A.sp1
A.sp2
A.sp3
A.sp4
A.grandisC.....
A.serpentina
A.sororcula
A.striata
A.bistrigata
A.amita

A.obliqua CGTGATCATGATCGTTATCGTGATGATTATCGCTCCCGTCGTCGATCGGTTACGCCCCAC
A.sp1
A.sp2
A.sp3
A.sp4A.....
A.grandisT.....
A.serpentinaT.....
A.sororcula
A.striataT.....
A.bistrigataT.....
A.amita

```

A.obliqua AACAGCCGCAATAGCTATCGAGGAGATCGCAGACGCCGATACGATCGCAGCCGAAGTCGT
A.sp1 .....
A.sp2 .....C.....T.....
A.sp3 .....G..G.....
A.sp4 .....
A.grandis ....A.....
A.serpentina .....
A.sororcula .....
A.striata .....
A.bistrigata .....
A.amita .....

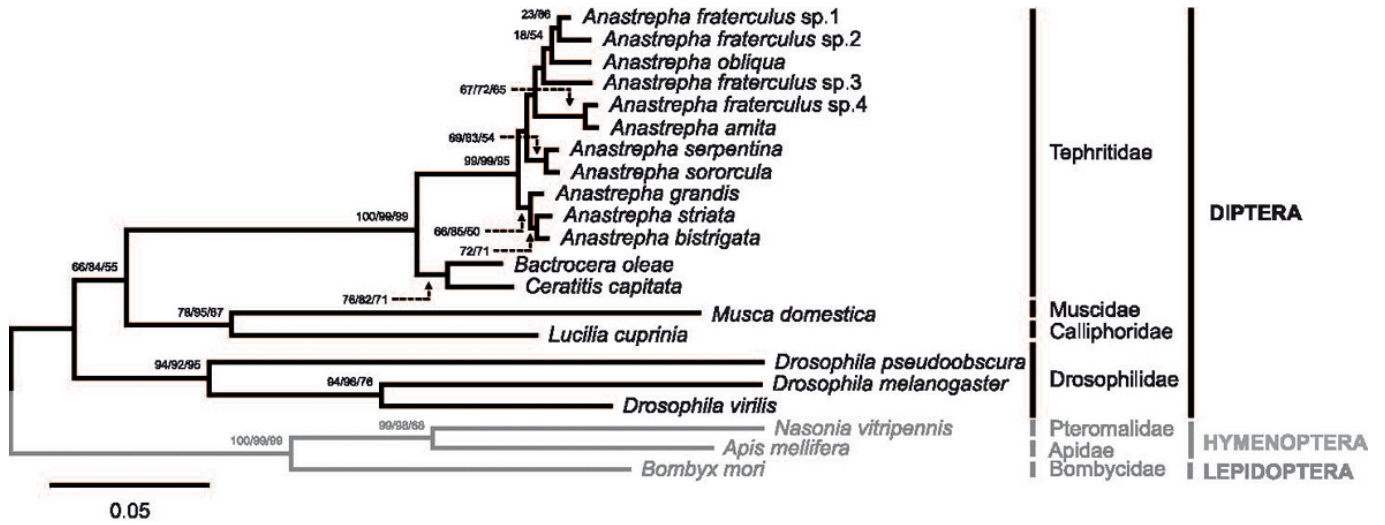
```

```

A.obliqua TCCTATTCACCGCGCGTACGCGCTATTAA
A.sp1 .....
A.sp2 .....
A.sp3 .....
A.sp4 .....
A.grandis .....
A.serpentina .....
A.sororcula .....
A.striata .....A.....
A.bistrigata .....A.....
A.amita .....

```

Anexo 2. Comparación de las secuencias correspondientes a los marcos abiertos de lectura de las proteínas Tra2 de las especies de *Anastrepha*, caracterizadas en este trabajo. Se toma la secuencia de Tra2 de *A. obliqua* como referencia. Los puntos representan nucleótidos iguales.



Anexo 3. Relaciones filogenéticas entre las proteínas Tra2. Análisis realizado por el Dr. J. M. Eirín-López, Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidade da Coruña, España.