Pietro Enrico Vicari Vento

Efeitos pleiotrópicos de genes da determinação sexual em aspectos reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

Pleiotropic effects of sex determination genes on sexual aspects of *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

São Paulo

2021

Pietro Enrico Vicari Vento

Efeitos pleiotrópicos de genes da determinação sexual em aspectos reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

Pleiotropic effects of sex determination genes on sexual aspects of *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia (Genética).

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Denise Selivon Scheepmaker

São Paulo

2021

Vicari, Pietro Enrico
Efeitos pleiotrópicos dos genes da determinação sexual em aspectos reprodutivos de *Anastrepha* sp.1 affinis *fraterculus* (Diptera, Tephritidae) / Pietro Enrico Vicari; orientadora Denise Selivon Scheepmaker – São Paulo, 2021.
84 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva.

1. moscas-das-frutas. 2. Desenvolvimento. 3. Determinação sexual. 4. Pleiotropia. I. Scheepmaker, Denise Selivon, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^{a}. Dr.^{a}. Denise S. Scheepmaker
Orientadora

I - Introdução

As moscas-das-frutas compõem uma família (Tephritidae) com mais de 4000 espécies descritas e que ocorrem em todos os continentes do planeta, exceto a Antártica. Como característica comum essas espécies têm o hábito de colocar seus ovos diretamente no interior de tecidos vegetais vivos, sendo que as moscas-das-frutas utilizam frutos para esse propósito. Neste caso, suas larvas eclodem no interior dos frutos e ali se desenvolvem, se alimentando dos tecidos vegetais vivos. Isso danifica os frutos, causando seu apodrecimento precoce, além de permitir a entrada de diversos patógenos através dos orifícios por onde os ovos foram depositados (Machota *et al.*, 2016). Como alguns de seus hospedeiros são espécies cultivadas, algumas moscas-das-frutas são consideradas pragas da fruticultura mundial. Dentre as espécies de maior importância econômica na região Neotropical destacam-se as espécies do complexo *Anastrepha fraterculus.* Trata-se de um conjunto de espécies crípticas (Selivon, 1996; Selivon & Perondini, 1998; Selivon *et al.*, 1999, 2004, 2005), sendo que no Brasil ocorrem pelo menos três espécies distintas: *A.* sp.1 *affinis fraterculus, A.* sp.2 *aff. fraterculus* e *A.* sp.3 *aff. fraterculus.* Análises morfológicas e moleculares revelam que existem pelo menos 8 espécies distintas na região Neotropical (Hernandez-Ortiz *et al.*, 2004, 2012, 2015; Prezotto, 2008; Sutton *et al.*, 2015).

Como são pragas de importância econômica e devido ao postulado de especiação recente desse grupo (Rezende *et al.*, 2016; Diaz *et al.*, 2018), as espécies de *Anastrepha* despertam grande interesse na comunidade científica internacional, tanto de uma perspectiva aplicada quanto por diversos aspectos de sua biologia básica e de sua evolução. Muitos dos estudos recentes têm se concentrado na compreensão dos mecanismos pelos quais se deu a evolução deste gênero e na caracterização das espécies do complexo *fraterculus* (Rull *et al.*,

2012, 2013; Brízová *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2013; Oroño *et al.*, 2013; Abraham *et al.*, 2014; Devescovi *et al.*, 2014). Dentre os aspectos estudados um que desperta grande interesse tanto do ponto de vista ontogenético quanto evolutivo se refere à determinação sexual desses insetos (Ruíz *et al.*, 2005, 2007a, 2007b; Sarno *et al.*, 2010).

O termo determinação sexual se refere à regulação e a evolução do desenvolvimento de características sexuais, que resultam em dimorfismos sexuais que desempenham importante papel na biologia e na evolução dos animais. Os sistemas de determinação sexual usam diferentes genes e mecanismos reguladores para estabilizar o desenvolvimento dos fenótipos masculinos e feminino nas diferentes espécies (Gempe & Beye, 2011). Em insetos, essa determinação está relacionada a expressão diferencial de uma cascata de genes que é relativamente conservada, sendo que genes ortólogos podem ser identificados em diferentes grupos de insetos com funções mais ou menos semelhantes (Verhlust *et al.*, 2010; Gempe & Beye, 2011).

O funcionamento dessa cascata em *Anastrepha* é conhecido (Fig. 1): o gene *transformer* (*tra*) fornece o dispositivo de memória da determinação sexual através de sua função auto-regulatória (Ruiz *et al.*, 2007b). Nas fêmeas (XX), supõem-se que a proteína Tra materna atue nos embriões regulando o *splicing* sexo-específico do gene *tra* durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, enquanto sua função auto-regulatória ainda não está estabelecida (Ruiz *et al.*, 2007b). Dessa forma, as fêmeas traduzem uma proteína Tra funcional. O cromossomo Y do tefritídeo *Ceratitis capitata* carrega um fator masculinizante (fator M) que determina o desenvolvimento do sexo masculino por reprimir direta ou indiretamente a função embrionária do gene *tra* (Willhofet & Franz, 1996; Pane *et al.*, 2002). A natureza molecular do fator M de *C. capitata* e de quatro espécies de *Bactrocera* foi identificada e o gene denominado *Maleness-on-the-Y* (*MoY*) (Mecariello *et al.*, 2019). Imagina-se que esse fator também exista e atue de modo semelhante em outros gêneros de tefritídeo

frugívoros (Sánchez, 2008). Desse modo, nos machos a proteína Tra materna não atua, o que leva à produção de um transcrito de RNAm com um códon de término da tradução precoce, resultando na produção de proteína Tra não funcional (Ruíz *et al.*, 2007b).

Como em outros insetos, o produto do gene *tra* e o produto do gene *transformer-2* (*tra*-2) são responsáveis por controlar o *splicing* sexo-específico do produto do gene *doublesex* (*dsx*) (Hedley & Maniatis, 1991; Hertel *et al.*, 1996; Ryner & Baker, 1991; Tian & Maniatis, 1993; Ruiz *et al.*, 2007a; Sarno *et al.*, 2010) que dá origem a duas proteínas distintas nos diferentes sexos, Dsx^M e Dsx^F (Ruiz *et al*., 2005, 2007a). Essas proteínas são fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes de citodiferenciação sexual (Burtis & Baker, 1989; Hoshijima *et al.*, 1991). É a expressão desses genes que faz com que um embrião apresente o desenvolvimento dos fenótipos masculino ou feminino.

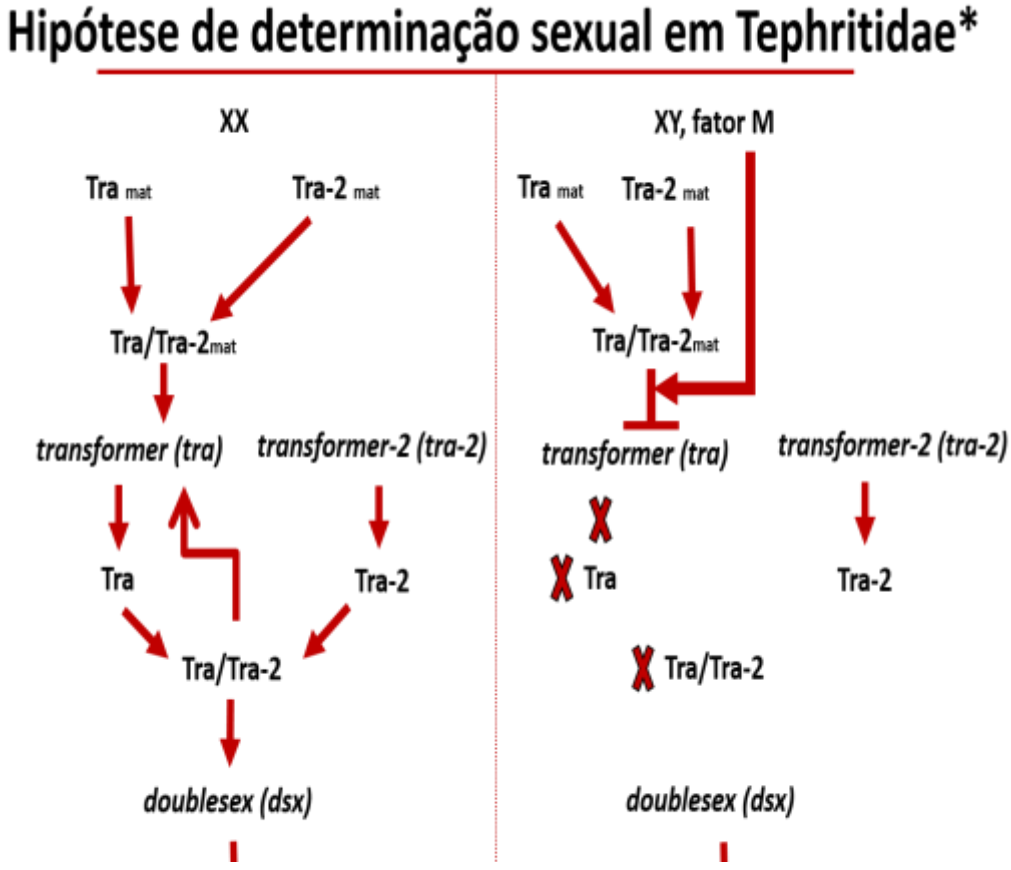

Figura 1 - Hipótese atual do funcionamento da cascata genética de determinação sexual em Tephritidae (Diptera). * modificado de Sarno e col. (2010)

Através de estudos recentes que usaram da técnica de RNAi passou-se a conhecer uma série de efeitos dos genes *tra* e *tra-2* nas moscas-das-frutas em uma perspectiva experimental. Dentre os efeitos relatados se destaca a transformação de fêmeas genotípicas em pseudomachos (XX) estéreis a partir da injeção de dsRNA de *tra* e/ou *tra-2* em embriões (Sarno *et al.*, 2010; Schetelig *et al.*, 2012) ou nos parentais de *Anastrepha* (Vicari *et al.*, 2021) *e* em *Bactrocera dorsalis* (Liu *et al.*, 2015). Nesses casos, na ausência das proteínas Tra e/ou Tra-2 funcionais nas fêmeas, ocorre uma alteração do padrão de *splicing* dos genes *tra* e *dsx*, que passam a ser processados com o padrão típico de machos. Por isso, indivíduos que são fêmeas genotípicas (XX) acabam por desenvolver o fenótipo masculino, os chamados pseudomachos – indivíduos com fenótipo masculino, mas que possuem os cromossomos sexuais femininos (XX). Com isso ocorre o desenvolvimento de um maior número relativo de machos, que pode chegar a valores próximos de 100% (Schetelig *et al.*, 2012).

Outras alterações em diversas características reprodutivas também foram relatadas nestes estudos. Machos F1 de fêmeas tratadas com dsRNA de *tra* e/ou *tra-2* apresentaram redução na fertilidade (Schetelig *et al.*, 2012; Vicari *et al*., 2021) e alterações no desenvolvimento dos testículos (Schetelig *et al.* 2012; Liu *et al.*, 2015; Vicari *et al*., 2021). Fêmeas adultas do tefritídeo *Bactrocera dorsalis* tratadas com dsRNA de *tra* apresentaram redução significativa na fecundidade (Peng *et al.*, 2015). Entretanto, nenhum desses estudos investigou de forma sistemática e detalhada essas outras alterações que vão além da determinação primária do sexo. A determinação do fenótipo sexual ocorre nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário dos tefritídeos (Morrow *et al.*, 2014). Apesar disso, os genes *tra*, *tra-2* e *dsx* são expressos em outros estágios ontogenéticos de *Anastrepha* (Ruiz *et al.*, 2005, 2007a, 2007b; Sarno *et al.*, 2010) e é possível que estejam relacionados a estes outros aspectos reprodutivos relatados nas imagos.

Além disso, sabe-se que a inibição da expressão da proteína Dsx^F está relacionada ao menor desenvolvimento dos ovários e na diminuição da fecundidade de fêmeas adultas de *B. dorsalis* (Chen *et al.*, 2008) e do lepidóptero *Corcyra caphalonica* (Passra *et al.*, 2014). Também são conhecidas alterações relacionadas ao comportamento sexual em outros insetos, como em *Drosophila*: fêmeas mutantes para o *tra* não só apresentam os tecidos desenvolvidos com características masculinas como apresentam comportamento típico de machos; já mutantes para *dsx* não apresentam tais alterações (McRobert & Tompkins, 1985). Machos ectopicamente expressando Dsx^F são cortejados por machos normais, o que indica que este pode estar associado a produção de feromônios (Waterburry *et al.*, 1999). O padrão de expressão de *dsx* no sistema nervoso de adultos é diferente nos sexos, e essa alteração deve se relacionar com as diferenças no comportamento reprodutivo desses animais (Rideout *et al.*, 2010).

Estes outros efeitos relacionados ao silenciamento dos genes de determinação sexual podem ser considerados efeitos pleiotrópicos. Todos os genes apresentam certo grau de pleiotropia, geralmente relacionados a uma organização modular, mas a maioria dos genes apresenta efeitos fenotípicos limitados (Stearns, 2010). O estudo dos efeitos pleiotrópicos dos genes pode prover importantes evidências sobre como se deu a evolução destes. Isso porque, de acordo com os modelos propostos, quanto maior o grau de pleiotropia mais estáveis são os genes ao longo do tempo, devido ao maior grau de seleção purificadora atuando sobre eles; genes com uma única função teriam maior propensão a acumular mutações que genes com várias funções (Marin & Baker, 1998). Isso porque uma mutação deletéria em um gene com alto grau de pleiotropia afetaria várias características, o que imporia um maior custo adaptativo. Desse modo, a pleiotropia exerceria resistência à mudança evolutiva (Marin & Baker, 1998; Stearns, 2010). Por serem genes reguladores que atuam sobre uma série de características relacionadas ao fenótipo sexual, seria esperado que os genes de determinação sexual de insetos fossem bastante conservados.

Porém estudos apontam que, ao menos em Diptera, as cascatas de determinação sexual evoluem muito rapidamente, em comparação com outras vias regulatórias (Schütt & Nöthiger, 2000).

A evolução da cascata de determinação sexual em insetos envolveu a aquisição de genes reguladores que foram sendo adicionados ao topo da cascata, que tem seus elementos da base como os mais antigos, traduzida como hipótese base-topo (Wilkins, 1995; Pomiankoswki *et al.*, 2004; Verhulst *et al.*, 2010; Eirin-López & Sánchez, 2015; Meisel, 2020; Adolfi *et al*., 2021). Um exemplo disso é o caso do gene *Sex-lethal* (*Sxl*). Esse gene foi cooptado através de seleção positiva para a função de determinação sexual em Drosophilidae, sendo que em outros insetos desempenha outras funções (Verhulst *et al.* 2010; Eirin-López & Sánchez, 2015). O *Sxl* passou a ser o regulador do topo da cascata, regulando o padrão de *splicing* do *tra* (Eirin-López & Sánchez, 2015). Sob esse modelo, é esperado que genes do topo da cascata apresentem maior variação entre os grupos de insetos, pois a manutenção de novas mutações seria favorecida por seleção positiva. Por outro lado, os genes da base se manteriam conservados ao longo do tempo, devido a seleção purificadora que atua mantendo a determinação dos fenótipos sexuais (Verhulst *et al.*, 2010).

Assim, na cascata de determinação sexual de insetos, os genes do topo seriam mais passíveis de mudanças ao longo do tempo, por terem uma única função (regular o gene logo abaixo deles), do que os genes da base, que controlam diretamente a expressão de outros genes, pois estes últimos teriam múltiplos efeitos (Marin & Baker, 1998). Entretanto, uma outra interpretação é possível, a chamada hipótese de restrições no desenvolvimento. Segundo essa hipótese, mutações nos genes envolvidos em aspectos mais iniciais do desenvolvimento (isto é, os do topo da cascata) teriam um custo adaptativo maior, pois mutações que ocorram neles afetariam a expressão dos genes que eles regulam. Nesse caso os genes do topo estariam sujeitos a níveis maiores de seleção purificadora,

enquanto os genes da base acomodariam melhor essas mudanças e, portanto, mudariam mais ao longo do tempo (Artieri *et al.*, 2009).

Como forma de elucidar quais destas interpretações estaria correta foi feita uma análise *in silico* a partir das sequências dos RNAm desses genes disponíveis em bancos de dados (Eirin-López & Sánchez, 2015). Nesta análise, foram consideradas 144 sequências de proteínas produzidas a partir dos genes *Sxl*, *tra*, *tra-2* e *dsx*, de 59 espécies diferentes, pertencentes a 6 ordens de insetos, incluindo 10 espécies de *Anastrepha*. Neste estudo verificou-se que, de forma geral, os genes da determinação do sexo evoluíram a taxas constantes, que são maiores que de outros genes analisados. Isso está de acordo com a ideia prévia de que os genes de determinação sexual evoluem de forma rápida nesses animais (Schütt & Nöthiger, 2000). Nesta análise (Eirin-López & Sánchez, 2015) conclui-se que os genes da base dessa cascata são mais diversos que os topo. Isso estaria de acordo com a segunda interpretação da evolução desta via, na qual os genes da base apresentariam maior variação (Artieri *et al*., 2009; Morrow *et al*., 2014). Entretanto, ainda segundo a análise, o gene *tra*, que corresponde ao topo da cascata na grande maioria das espécies analisadas, foi o que evoluiu mais rápido (Eirin-Lópex & Sánchez, 2015). É possível que o gene *tra* tenha suas regiões reguladoras, os domínios SR (ricos em serina-arginina, relacionados a interações proteína-proteína) conservadas, enquanto outras regiões evoluem de forma rápida (Eirin-López & Sánchez, 2015) ou que eles apresentem maior variação ao longo da evolução por serem menos pleiotrópicos (Marin & Baker, 1998).

Ou seja, esses resultados contraditórios da análise *in silico* (Eirin-López & Sánchez, 2015) representam uma inconsistência quanto a interpretação da evolução dessa via, pois não é possível determinar qual dos aspectos é preponderante na evolução desta cascata: a seleção conservando os genes base – no caso o *dsx*, por atuar na regulação direta de vários outros genes-, a seleção conservando os genes do topo – no caso o *tra*, pois mudanças neste afetariam toda a cascata- ou ambos, uma vez que a ocorrência destes fenômenos não seria

excludente. Entretanto, não há trabalhos que fomentem nenhuma dessas interpretações de uma perspectiva experimental, sendo que uma estimativa dos efeitos pleiotrópicos dos genes que constituem essa cascata poderia contribuir para testar se de fato esses fenômenos atuaram ao longo da evolução desses genes (Lucas Sánchez e Mattew Rockman, comunicação pessoal).

Nessa perspectiva, as moscas do gênero *Anastrepha* são um promissor caso a ser investigado, uma vez que são um grupo de espécies que constitui grande parte das análises *in silico* feitas até o momento (Eirin-López & Sánchez, 2015). Além disso, são conhecidas uma série de alterações relacionadas à expressão dos genes *tra*, *tra-2* e *dsx* em tefritídeos, como alterações morfológicas (Chen *et al.*, 2008, Schetelig *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015), alterações na fecundidade e na fertilidade (Schetelig *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2015; Vicari *et al.*, 2021) além de possíveis alterações comportamentais (Teixeira, 2017). Estas alterações compreendem caracteres que podem ser mensurados e comparados, de forma a testar se há variação nos graus das alterações fenotípicas relacionadas à expressão desses genes e, caso existam, se estes podem estar relacionados à evolução dessa cascata (Marin & Baker, 1998; Erin-López & Sánchez, 2015). Assim, o conhecimento dos efeitos pleiotrópicos dos genes da cascata de determinação sexual em insetos poderiam não só contribuir para o conhecimento mais profundo das funções destes, sobretudo as funções que desempenham em outros estágios do ciclo de vida desses insetos, mas também poderiam fornecer importantes evidências sobre como se deu a história evolutiva dessa cascata gênica.

Nesse estudo, buscou-se fazer uma análise dos efeitos pleiotrópicos em aspectos reprodutivos dos genes de determinação sexual (*tra*, *tra-2* e *dsx*) em uma espécie de *Anastrepha*, a fim de determinar qual das hipóteses para evolução dos genes da cascata de determinação possui mais evidência segundo essa abordagem.

VI – Conclusões

Através deste estudo pode-se concluir que:

- o silenciamento gênico de *transformer* causou redução da fecundidade e da fertilidade de fêmeas, redução no tamanho dos ovos, redução da ocorrência do comportamento de oviposição, e aumento da ocorrência de comportamentos não relacionados à reprodução;
- o silenciamento gênico de *transformer-2* causou redução do tamanho dos ovos e no tamanho dos ovários;
- o silenciamento gênico de *doublesex* causou redução da fecundidade e da fertilidade de fêmeas, redução da proporção de eclosão e do tamanho dos ovos, redução no tamanho dos ovários, diminuição do comportamento de oviposição com aumento da ocorrência de descanso em fêmeas e diminuição de comportamentos sexuais em machos com aumento da ocorrência de descanso;
- existe relação entre o grau de pleiotropia dos genes *transformer* e *doublesex* e a diversidade molecular desses genes (mensurada na literatura);
- o gene da base da cascata de determinação genética (*doublesex*) apresentou maior pleiotropia que o gene do topo (*transformer*), o que está de acordo com o previsto pela hipótese base-topo de evolução da cascata de determinação sexual, proposta por Wilkins (1995);
- O gene *transformer-2* apresenta o menor grau de pleiotropia apesar de ser o gene mais conservado; essa relação ainda precisa ser investigada;
- As proteínas Tra e Tra2 materna são fundamentais para o desenvolvimento do fenótipo feminino em etapas iniciais do desenvolvimento embrionário;
- Os resultados indicam que alterações na expressão desses genes potencialmente podem ser utilizadas em estratégias de controle populacional.

Resumo

As moscas-das-frutas (Tephritidae) são pragas da fruticultura mundial cuja biologia é amplamente estudada. Um aspecto fundamental é sua determinação sexual. Esta se dá através da expressão sexo-específica dos genes *transformer*, *transformer*-2 e *doublesex*, que se organizam na forma de uma cascata de controle genético. São conhecidos uma série de efeitos relacionados ao silenciamento desses genes, como alterações do fenótipo sexual, no desenvolvimento das gônadas, redução da fecundidade e alterações comportamentais. Entretanto nenhum trabalho que compare os diferentes níveis dessa cascata de forma experimental foi feito até o momento. Este estudo poderia prover evidências sobre como se deu a diversificação dessa cascata ao longo da evolução. Existem duas hipóteses principais: a primeira (a) propõe que genes da base seriam mais pleiotrópicos e por isso mais conservados; enquanto a outra (b) propõe que os genes do topo seriam mais conservados, pois mutações nesses genes teriam maior custo adaptativo. Neste estudo pretendeu-se testar essas hipóteses apresentadas comparando os efeitos do silenciamento dos genes *transformer*, *transformer*-2 e *doublesex* em características reprodutivas de *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*. Os indivíduos foram tratados com dsRNA dos genes de determinação sexual e foram testados quanto a: (a) fertilidade e fecundidade (fêmeas), (b) tamanho dos ovos produzido, (c) morfologia de gônadas (machos e fêmeas) e (d) comportamento reprodutivo (machos e fêmeas), além de testar a possibilidade de efeito materno. Os resultados indicam maior grau de pleiotropia no gene presente na base da cascata de determinação sexual (*doublesex*), o que estaria de acordo com a hipótese base-topo. Além disso, os resultados indicam que alterações na expressão desses genes têm o potencial de serem utilizadas em estratégias de controle populacional desse inseto-praga.

Abstract

Fruit flies (Tephritidae) are worldwide fruticulture pests, and their biology is widely studied. A key aspect is their sex determination. This occurs through the sex-specific expression of the *transformer*, *transformer-2* and *doublesex* genes, which are organized in a genetic control cascade. Several effects related to the silencing of these genes are known, such as changes in the sexual phenotype, on the development of the gonads, reduction in fertility besides behavioral changes. However, there is no study that compares the different levels of this cascade in an experimental approach. This study could provide evidence on how this cascade diversified throughout evolution. There are two main hypotheses: the first (a) proposes that base genes would be more conserved due to greater level of pleiotropy; while the other (b) proposes that the genes at the top would be more conserved, since mutations would have a higher adaptive cost. This study aimed to test these hypotheses presented by comparing the effects of silencing the *transformer*, *transformer-2* and *doublesex* genes on reproductive traits of *Anastrepha* sp.1 aff. *fraterculus*. Individuals were treated with dsRNA from sex determination genes and were tested for: (a) fertility and fecundity (females), (b) size of eggs, (c) gonad morphology (males and females) and (d) reproductive behavior (males and females), as well as testing the possibility of maternal effect. The results indicate greater levels of pleiotropy in the gene present at the base of the sex determination cascade (*doublesex*), which is in line with bottom-up hypothesis. Furthermore, the results indicate that alterations in the expression of these genes have the potential to be used in population control strategies for this insect pest.

Referências Bibliográficas

Abraham, S., Rull, J., Mendoza, M., Liendo, M.C., Devescovi, F., Koriz, A.K., Kovaleski, A., Segura, D.F. & Vera, M.T. (2014). Differences in sperm storage and remating propensity between adult females of two morphotypes of the *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. *Bulletin of Entomological Research*, *104*, 376-382.

Artieri, C. G., Haerty, W. & Singh, R. S. (2009). Ontogeny and phylogeny: molecular signatures of selection, constraint, and temporal pleiotropy in the development of *Drosophila*. *BMC biology*, *7*, 42.

Boller, E. F. (1968). An artificial oviposition device for the european cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*. *Journal of Economic Entomology*, *61*, 850-852.

Brízóva, R., Mendonça, A.L., Vanícková, L., Mendonça, A.L., Da Silva, C.E., Tomcala, A., Paranhos, B.A.J., Dias, V.S., Joachim-Bravo, I.S., Hoskovec, M., Kalinová B. & Nacimento, R.R. (2013). Pheromone analyses of the Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae) cryptic species complex. Florida Entomologist, 96, 1107-1115.

Burtis, K.C. & Baker, B.S. (1989). *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*, *56*, 997-1010.

Chen, S. L., Dai, S. M., Lu, K. H. & Chang, C. (2008). Female-specific *doublesex* dsRNA interrupts *yolk* protein gene expression and reproductive ability in oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Insect biochemistry and molecular biology*, *38*(2), 155-165.

Devescovi, F., Abraham, S., Roriz, A.K.P., Nolazco, N., Castañeda, R., Tadeo, E., Caceres, C., Segura, D.F., Vera, M.T., Joachim-Bravo, I., Canal, N. & Rull, J. (2014). Ongoing speciation within the *Anastrepha fraterculus* cryptic

species complex: the case of the andean morphotype. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *152*, 238–247.

Diaz, F., Lima, A. L. A., Nakamura, A. M., Fernandes, F., Sobrinho Jr, I. & De Brito, R. A. (2018). Evidence for introgression among three species of the Anastrepha fraterculus group, a radiating species complex of fruit flies. *Frontiers in Genetics*, *9*, 359.

Eirín-López, J. M. & Sánchez, L. (2015). The comparative study of five sex-determining proteins across insects unveils high rates of evolution at basal components of the sex determination cascade. *Development genes and evolution*, *225*, 23-30.

Gempe, T. & Beye M. (2011). Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *Bioessays*, *33*, 52–60.

Häcker, I., & Schetelig, M. F. (2021). Genome editing for insect pest control: curse or blessing? In J. Hendrichs, R. Pereira, & M. J. B. Vreysen (Eds.), Area Wide Integrated Pest Management: Development and Field Application (pp. 824-842). Taylor & Francis Group.

Hedley, M. & Maniatis, T. (1991). Sex-specific splicing and polyadenylation pf *dsx* pre-mRNA requires a sequence that binds specifically to Tra-2 protein *in vitro*. *Cell*, *65*, 579-586.

Hernandez-Ortiz, V., Gómez-Anaya, J.A., Sánchez, A., McPheron, B.A. & Aluja, M. (2004). Morphometric analysis of mexican and south american populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research*, *94*, 487-499.

Hernandez-Ortiz, V., Bartolucci, A., Morales-Valles, P., Frías, D. & Selivon, D. (2012). Cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae): a multivariate approach for the recognition of south american morphotypes. *Annals of Entomological Society of America*, *105*, 305-318.

Hernández-Ortiz, V., Canal, N.A., Salas, J.O.T., Ruíz-Hurtado, F.M. & Dzul-Cauich, J.D. (2015). Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the mesoamerican and pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). *Zookeys*, *540*, 95.

Hertel, K.J., Lynch, K.W., Hsiao, E.C., Liu, E.H. & Maniatis, T. (1996). Structural and functional conservation of the *Drosophila doublesex* splicing enhancer repeat elements. *Rna*, *2*, 969-98.

Hoshijima, 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.

Liu, G., Wu, Q., Li, J., Zhang, G. & Wan, F. (2015). RNAi-mediated knock-down of *transformer* and *transformer-2* to generate male-only progeny in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Plos One*, *10*, e0128892.

Lopes, G. N., Arias, O.R., Cônsoli, F.L. & Zucchi, R.A. (2013). The identity of specimens of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae) with atypical aculeus tip. *Neotropical Entomology*, *42*, 618-627.

Machota, R., Bortoli, L. C., Cavalcanti, F. R., Botton, M., & Grützmacher, A. D. (2016). Assessment of injuries caused by *Anastrepha fraterculus* (Wied.)(Diptera: Tephritidae) on the incidence of bunch rot diseases in table grape. *Neotropical entomology*, *45*(4), 361-368.618-627, 2013.

Marın, I., & Baker, B. S. (1998). The evolutionary dynamics of sex determination. *Science*, *281*(5385), 1990-1994.

McRobert, S. P., & Tompkins, L. (1985). The effect of *transformer*, *doublesex* and *intersex* mutations on the sexual behavior of *Drosophila* melanogaster. *Genetics*, *111*, 89-96.

Meccariello A, Salvemini M, Primo P, Hall B et al. (2019) *Maleness-on-the-Y* (*MoY*) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests. *Science 365* (6460): 1457-1460.

Morrow, J. L., Riegler, M., Frommer, M., & Shearman, D. C. A. (2014). Expression patterns of sex-determination genes in single male and female embryos of two *Bactrocera* fruit fly species during early development. *Insect Molecular Biology*, *23*, 754-767.

Oroño, L., Paulin, L., Alberti, A.C., Hilal, M., Ovruski, S., Vilardi, J.C., Rull, J. & Aluja, M. (2013). Effect of host plant chemistry on genetic differentiation and reduction of gene flow among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) populations exploiting sympatric, synchronic hosts. *Environmental Entomology*,*42*, 790-798.

Pane A, Salvemini M, Delli Bovi P, Polito LC, Saccone G (2002) The *transformer* gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development 129*: 3715-3725.

Passra, H., Veerana, M., & Ngernsiri, L. Double strand RNA of female *doublesex* gene effects the ovary development in rice moth, *Corcyra cephalonica*. *26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and Internatcional Conference*, 2014.

Peng, W., Zheng, W., Handler, A. M., & Zhang, H. (2015). The role of the *transformer* gene in sex determination and reproduction in the tephritid fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Genetica*, *143*, 717-727.

Pomiankowski, A., Nöthiger, R., & Wilkins, A. (2004). The evolution of the *Drosophila* sex-determination pathway. *Genetics*, *166*, 1761-1773.

Prezotto, L. (2008). *Análise do ITS1 do DNA ribossomal em espécies do complexo Anastrepha fraterculus*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo.

Rendón, P., & Enkerlin, W. (2021). Area-wide fruit fly programmes in Latin America. In J. Hendrichs, R. Pereira, & M. J. B. Vreysen (Eds.), Area wide integrated Pest management: Development and field application (pp. 161-196).

Rezende, V. B., Congrains, C., Lima, A. L. A., Campanini, E. B., Nakamura, A. M., Oliveira, J. L., Chahad-Ehlers, S., Sobrinho, I. & Brito, R. A. (2016). Head transcriptomes of two closely related species of fruit flies of the Anastrepha fraterculus group reveals divergent genes in species with extensive gene flow. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, g3-116.

Rideout, E. J., Dornan, A. J., Neville, M. C., Eadie, S., & Goodwin, S. F. (2010). Control of sexual differentiation and behavior by the *doublesex* gene in *Drosophila melanogaster*. *Nature neuroscience*, *13*, 458.

Ruiz, M. F., Stefani, R. N., Mascarenhas, R. O., Perondini, A. L., Selivon, D., & Sánchez, L. (2005). The gene *doublesex* of the fruit fly *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *Genetics*.

Ruiz, M. F., Eirín-López, J. M., Stefani, R. N., Perondini, A. L., Selivon, D., & Sánchez, L. (2007). The gene *doublesex* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *Development genes and evolution*, *217* 725-731.

Ruiz, M. F., Milano, A., Salevmini, M., Eirin-López, J.M., Perondini, A.L.P., Selivon, D., Polito, C., Saccone, G. & Sánchez, L. (2007). The Gene transformer of Anastrepha fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. Plos One, 2(11), E1239. 2007.

Rull, J., Abraham, S., Kovaleski, A., Segura, D.F., Islam, A., Wornoyaporn, V., Dammalage, T., Santo Tomas, U. & Vera, M.T. (2012). Random mating and reproductive compatibility among argentinean and southern brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research*, *102*, 435-443.

Rull, J., Abraham, S., Kovaleski, A., Segura, D.F., Mendoza, M., Liendo, M.C. & Vera, M.T. (2012). Evolution of pre-zygotic and post-zygotic barriers to gene flow among three cryptic species within the *Anastrepha fraterculus* complex. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *148*, 213–222.

Ryner, L.C. & Baker, B.S. (1991) Regulation of *doublesex* pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation. *Genes Development*, 5, 2071-2085.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sarno, F., Ruiz M.F., Eirin-López, J.M., Perondini, A.L.P., Selivon, D. & Sánchez, L. (2010). The gene *transformer-2* of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *BMC Evolutionary Biology 10*, 140.

Schetelig, M.F., Milano, A., Saccone, G. & Handler, A.M. (2012) Male only progeny in *Anastrepha suspensa* by RNAi-induced sex reversion of chromosomal females. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*, 51-57.

Schutt, C., & Nothiger, R. (2000). Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development*, *127*, 667-677.

Segura, D., Petit-Marty, N., Sciurano, R., Vera, T., Calcagno, G., Allinghi, A., & Vilardi, J. (2007). Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, *90*, 154-162.

Selivon, D. (1996). *Estudo sobre a diferenciação populacional em Anastrepha fraterculus (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae)*. Tese de Doutorado, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Selivon, D. & Perondini, A.L.P. (1998). Eggshell morphology in two cryptic species of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, *91*, 473-478.

Selivon, D.; Perondini, A.L.P. & Morgante, J.S. (1999). Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera, Tephritidae). *Genetics and Molecular Biology*, *22*, 507–510.

Selivon, D.; Perondini, A.L.P. & Morgante, J.S. (2005). A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex

(Diptera, Tephritidae). *Annals of Entomological Society of America*, *98*, 367-381.

Stearns, F. W. (2010). One hundred years of pleiotropy: a retrospective. *Genetics*, *186*, 767-773.

Sutton, B. D., Steck, G.J., Norrbom, A.L., Rodriguez, E.J., Srivastava, P., Alvarado, N.N., Colque, F., Land, E.Y., Sánchez, J.J.L., Quisberth, E., Peñarada, E.A., Clavijo, P.A.R., Alvarez-Baca, J.K., Zapata, T.G. & Ponce, P. (2015). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) variation in the *Anastrepha fraterculus* cryptic species complex (Diptera, Tephritidae) of the Andean Region. *Zookeys*, *540*, 175.

Teixeira, I. L. A. (2017). *Silenciamento dos genes fruitless e period: efeitos no comportamento locomotor e reprodutivo de Anastrepha sp.1 affinis fraterculus (Diptera, Tephritidae)*. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. Doi:10.11606/T.41. 2018.Tde-02042018-113118.

Vera, M. T., Cáceres, C., Wornoayporn, V., Islam, A., Robinson, A. S., De La Vega, M. H., ... & Cayol, J. P. (2006). Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, *99*, 387-397.

Verhulst, E. C., van de Zande, L. & Beukeboom, L. W. (2010). Insect sex determination: it all evolves around *transformer*. *Current opinion in genetics & development*, *20*, 376-383.

Vicari, P. E. (2016). Efeitos do silenciamento gênico de transformer-2 a partir da aplicação de RNAi parental em Anastrepha sp.1 affinis fraterculus (Diptera, Tephritidae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/D.41.2016.tde-20102016-164736.

Vicari, P.E., Chang, E. S., Perondini, A. L. P., Selivon D. (2021) Parental RNAi Silencing of the transformer-2 Gene in a Species of the *Anastrepha*

fraterculus Complex of Cryptic Species (Diptera, Tephritidae). *Journal of Agricultural Science*; 13 (10).

Waterbury, J. A., Jackson, L. L. & Schedl, P. (1999). Analysis of the doublesex female protein in *Drosophila melanogaster*: role in sexual differentiation and behavior and dependence on intersex. *Genetics*, *152*, 1653-1667.

Wilkins, A. S. (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: 737-745