

## Caracterización morfológica y variación genética de *Anastrepha distincta* mediante la técnica RAPD-PCR

Morphological characterization and band profile of *Anastrepha distincta* using RAPD-PCR

Linda Sánchez-Tuesta; Zulita Prieto\*

Laboratorio de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

\*Autor correspondiente: [zprieto@unitru.edu.pe](mailto:zprieto@unitru.edu.pe) (Z. Prieto).

Fecha de recepción: 18 07 2018. Fecha de aceptación: 20 08 2018

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue describir las características morfológicas de caracteres taxonómicos y evaluar las variaciones alélicas mediante la técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) del estado adulto de *Anastrepha distincta*, plaga que ataca al guabo (*Inga* sp). Los individuos fueron colectados en la etapa de larva y criados en laboratorio hasta obtener el estado adulto. Se realizaron los montajes de alas, el estuche de ovipositor y ovipositor de 10 individuos hembras, así mismo, se extrajo ADN genómico de cabeza y tórax y se realizó las pruebas RAPD con los iniciadores OPC 05 y OPC 10. El diseño alar se caracterizó por la presencia de la banda costal unida a la banda S, mancha hialina costal de R1 que llega hasta la vena R<sub>4+5</sub> y la banda S separada de la banda V con ambos brazos delgados, y con las pruebas RAPD, se registró 4 loci monomórficos y 10 polimórficos con OPC 10 y 3 loci monomórficos y 11 polimórficos para el iniciador OPC 05. Se determinó la especie *A. distincta* tomando como base las características taxonómicas indicadas y se reporta alto grado de polimorfismo en las muestras analizadas.

**Palabras clave:** Caracterización morfológica; RAPD-PCR; *Anastrepha distincta*.

### ABSTRACT

The objective of the present work was to describe the morphological characteristics of taxonomic characters and to evaluate the allelic variations by means of the *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) technique of the adult state of *Anastrepha distincta*, a plague that attacks the guabo (*Inga* sp). The individuals were collected in the larva stage and reared in the laboratory until obtaining the adult stage. The wing assemblies, the ovipositor and ovipositor kit of 10 female individuals were performed, and genomic DNA was extracted from the head and thorax and the RAPD tests were performed with the OPC 05 and OPC 10 primers. They alar design is characterized by the presence of the costal band attached to the S band, hyaline costal spot of R1 that reaches the R 4 + 5 vein and the S band separated from the V band with both thin arms, and with the RAPD tests, it was recorded 4 monomorphic and 10 polymorphic loci with OPC 10 and 3 monomorphic loci and 11 polymorphic loci for the OPC 05 initiator. The *A. distincta* species was determined based on the indicated taxonomic characteristics and a high degree of polymorphism was reported in the samples analyzed.

**Keywords:** morphological characterization; RAPD-PCR; *Anastrepha distincta*.

## INTRODUCCIÓN

El género *Anastrepha* (Familia Tephritidae) está conformado por un gran número de especies, que constituyen las principales plagas de plantaciones frutales (Norrbon *et al.*, 2015; Barr *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2018). Dentro del grupo *fraterculus*, se describe a *Anastrepha distincta*, especie que infesta principalmente al cultivo *Inga edulis*, seguidos por la vid, guayaba y chirimoya (Vilatuña *et al.*, 2016), *A. distincta* se encuentra también, en otros frutales, tales como durazno, palto y lúcumo y coexisten con otras moscas de la fruta, como *A. fraterculus* (Gordillo y Pizarro 2016).

En relación a la diferenciación de especies de *Anastrepha*, Korytkowski y Ojeda (1968) consideran los caracteres: patrones alares, el tamaño y forma del extremo terminal del ovipositor, el tercer instar larvario. Recientemente, Figueiredo *et al.* (2017) reportaron, que algunas especies de *Anastrepha*, presentan una capa trabecular adicional en el corion de los huevos que tienen utilidad en la diferenciación de especies. No obstante, en algunas especies de *Anastrepha fraterculus*, las características morfológicas no permiten distinguirlos y son denominadas especies crípticas (Hernández-Ortiz *et al.*, 2015). Para una mayor aproximación de las diferencias entre especies relacionadas y variaciones intrapoblacionales, la utilidad de las técnicas moleculares ha quedado más que demostrada.

En especies de *Anastrepha*, la técnica RAPD, técnica de reacción en cadena de la polimerasa que utiliza cebadores arbitrarios, ha sido usada por diferentes investigadores como Basso *et al.* (2003), quienes analizaron polimorfismos del ADN de varias poblaciones sudamericanas de *A. fraterculus*; Shi y Lawrence (1999) emplearon RAPD para determinar marcadores del ADN de una línea de células embrionarias de *A. suspensa* susceptibles a la infección por un entomopoxivirus. Gómez-Viveros *et al.* (2008) diferenciaron tres especies del género *Anastrepha*: *A. ludens*, *A. oblicua* y *A. striata* con 14 cebadores de secuencias aleatorias de la serie C y obtuvieron mejores resultados con los cebadores OPC 5 y OPC 10. Estudios recientes en

*Anastrepha spp.*, aportan información sobre secuencias de nucleótidos del gen Citocromo C Oxidasa I (COX1) (Marín, 2017).

Sin embargo, en *A. distincta* sólo existen escasos reportes sobre sus características morfológicas y ninguna sobre marcadores moleculares

En el Perú, *A. distincta* fue reportado en diferentes regiones de la costa, sierra y selva, con mayor frecuencia en la selva y la costa, y en las zonas de Ica y Piura observaron que la presencia de *Anastrepha* depende del hospedero más que la variación de temperatura (Nolasco y Iannacone, 2008). Para evaluar las estrategias de prevención y control es importante considerar los conocimientos sobre la taxonomía de las especies, la variación intrapoblacional además de las formas de infestación, la magnitud de daño y la relación de especie- huésped.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar las características morfológicas de las alas, y la variación genética mediante RAPD con los iniciadores OPC 5 y OPC 10 de adultos de la especie *Anastrepha distincta*, colectadas del cultivo *Inga sp.* "guaba o paca", La Libertad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico

Se recolectaron frutos de *Inga sp.* "guaba" infestados con larvas de *A. distincta* procedentes de Alto Laredo, ubicado en el distrito de Laredo, provincia de Trujillo, departamento de La Libertad. El material biológico recolectado fue llevado al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Asimismo, se recibieron individuos adultos de *A. distincta* donados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú, sede Virú, Perú.

### Obtención del estado adulto

Las larvas fueron adecuadas en cajas acondicionadas según Marigorda (2014), temperatura  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad de 80%. Las larvas fueron alimentadas con el fruto de *Inga sp.* hasta el estado de pupa, y estas a su vez, fueron transferidas a vasos de plástico, se mantuvo la humedad necesaria hasta la emergencia del adulto.

**Tabla 1.** Secuencias de cebadores RAPD-PCR utilizados para la amplificación de ADN de *A. distincta*

N.º	Cebador	Secuencia	Rango de Tamaño esperado	Tº
1	OPC05	5'-GATGACCGCC-'3	1000-3300	33,4
2	OPC10	5'-TGTCGTGGTG-'3	900-3000	35,6

Disección y montaje de *A. distincta* adulto  
Se realizó la disección de 10 individuos hembras en estado adulto, para ello se utilizó un estereoscopio con aumentos de 3 a 11,5 X. Las alas y el ovipositor de cada individuo fueron conservadas en los montajes realizados en láminas porta-objetos. Para ello, las alas, el estuche del ovipositor y ovopositor extraídos fueron colocados en hidróxido de potasio (KOH) al 10% por 10 minutos, luego se agregó una o dos gotas del reactivo sellante y se cubrió con la lámina cubreobjetos (Korytkowski y Ojeda, 1968; Martínez-Alava 2007).

#### Caracterización morfológica

Las muestras de cada individuo fueron evaluadas con la clave taxonómica según Korytkowski (2001), Caraballo (2001), Marangoni (2013), teniendo como referencia, a su vez, las muestras identificadas de *A. distincta* del laboratorio de SENASA, del distrito de Virú.

Para la toma de datos se consideraron los caracteres morfológicos: diseño alar (forma, disposición y coloración de las bandas alares y características de la venación); longitud alar, del ovipositor, y forma y longitud del estuche del ovipositor (Korytkowski y Ojeda, 1968; Caraballo, 2001; Korytkowski, 2001).

#### Caracterización molecular mediante la técnica RAPD

##### Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN se utilizó la cabeza y el tórax de cada uno de los ejemplares y se procedió por el método de Cheung *et al.* (1993) y Asghar *et al.* (2015). Cada tejido fue colocado en un tubo Eppendorf de 1,5 µl al que se le agregó 300 µl de buffer de lisis (200 Mm tris-HCL, pH 8,5, 250 Mm NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% (SDS). Se agregó 75 µl de SDS y el homogenizado se incubó a 60 °C por 4 h y se centrifugó a 14000 rpm por 15 min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se le adicionó 168,75 µl de acetato de amonio y 300 µl de isopropanol frío, y se incubó a una temperatura de -20 °C por 2 h. Las muestras fueron centrifugadas a

14000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante, el pellet se lavó con 300 µl de etanol al 70 %, se eliminó el etanol y se secó el pellet a temperatura ambiente y finalmente se re-suspendió el ADN en 100 µl de buffer TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM), para ser conservado a una temperatura de -20 °C hasta su utilización. El ADN se cuantificó por espectrofotometría y se estimó su calidad en gel de agarosa al 1 % con buffer TAE 1X como buffer de corrida.

#### Amplificación

El ADN extraído se amplificó utilizando los cebadores de secuencia aleatoria Operon serie C (OPC-5 y OPC-10) (Tabla 1)(Gómez-Viveros, 2008, Khan *et al.*, 2013, Christudhas y Mathai, 2014). La mezcla de reacción: 5µl de buffer 5x, 2 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de primer, 1 µl de ADN y 13,88 µl de agua libre de nucleasas, en un volumen final de 25µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) de 0,2 ml, con la programación siguiente: un ciclo de 94 °C por 5 min, 45 ciclos de 94 °C por 1 min, 37 °C (OPC 10) o 40 °C (OPC 05) por 1 min y 72 °C por 2 min (Skoda *et al.*, 2013).

Los productos amplificados con los primer OPC 05 y OPC 10 fueron separados en gel de agarosa al 2%, 100 V por 40 min en buffer TAE 1X. La lectura del corrido de los geles fue observada y fotografiada por el documentador Chemidoc. Se determinó el número de loci monomórficos y polimórficos.

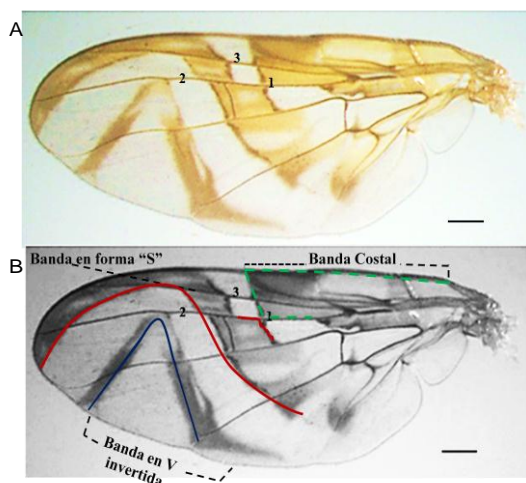
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*A. distincta* fue confundida con *A. fraterculus* hasta antes de la descripción de Stone (1942) (Citado en Norrbom *et al.*, 1999), quien señaló claramente las diferencias entre ambas especies.

#### Caracterización morfológica

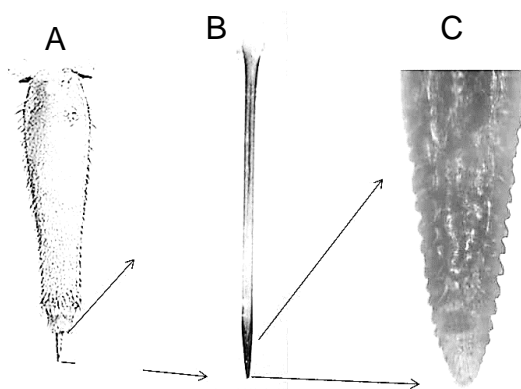
En las alas, la banda costal unida con la banda S que llega a la vena R 4+5, la sección apical de la banda S es delgada; las bandas S y V están separadas; la banda V tiene ambos brazos delgados; el brazo distal está separado del proximal en

su porción superior; la vena R 4+5 es casi recta y la curva apical de la vena M es moderada (Figura 1).



**Figura 1.** Ala de *Anastrepha distincta*. A. 1. Banda costal y banda S ligeramente unidas; 2. Banda S y banda V separadas. B. Esquema del diseño alar.

En la figura 2 se muestra el estuche del ovipositor de *A. distincta*, retraído y emergido, así como el ovipositor, vista total y del ápice.



**Figura 2.** Estuche del ovipositor de *Anastrepha distincta*. A. Estuche con el ovipositor emergido. B. Ovipositor, vista total. C. Vista ventral del ápice del ovipositor.

En la tabla 2 se registran las mediciones de las alas y del ovipositor de las muestras obtenidas de campo y las reportadas por Korytkowski y Ojeda (1968), la longitud promedio de las alas fue  $7,11 \pm 0,09$ , la forma denticulada del ápice del aculeus fue observada entre 12 a 14 dientes de forma redondeada y los promedios del estuche del ovipositor y del ovipositor fueron  $3,01 \pm 0,04$  mm y  $3,06 \pm 0,07$  mm.

**Tabla 2.** Comparación de los caracteres morfológicos de *Anastrepha distincta* encontrados con lo descrito por Korytkowski y Ojeda (1968)

Carácter taxonómico	Reportado en el presente trabajo	Korytkowski y Ojeda (1968)
Ala: Banda S y banda C	Unidas	Unidas
Ala: Banda S separada de la banda V	Separadas	Separadas
Ala: Mancha hialina R1	Presente y llega hasta la vena R4+5	Presente y llega hasta la vena R4+5
Longitud alar (mm)	6,96 a 7,25	6,00 a 7,50
Longitud del estuche del ovipositor (mm)	2,30 a 3,10	2,30 a 3,50
Longitud del ovipositor (mm)	2,90 a 3,10	2,25 a 3,60

En todos los individuos de *A. distincta* se observó la presencia de la banda costal y la banda S tocándose sobre la vena R 4+5, la banda V invertida separada de la banda S, características alares concordantes con lo descrito por Korytkowski y Ojeda (1968) y Vilatuña *et al.* (2010). Quienes también indican que la amplitud de la unión de la banda costal con la banda S es mayor en *A. fraterculus* que en *A. distincta*, y la banda V invertida unida a la banda S. en *A. distincta* ha sido confundida con *A. distans*, aun cuando en esta última la banda V está estrechamente ligada a la banda S, lo que no sucede en *A. distincta*.

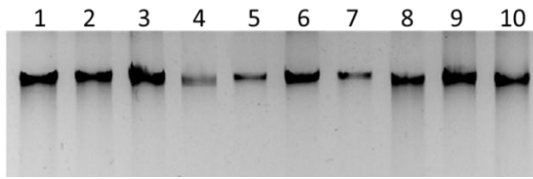
El número de dientes en el ápice del aculeus de *A. distincta*, es distinto a la *A. fraterculus*, ésta última, tiene dientes romos y redondeados con una marcada constricción antes de la sierra del aculeus (Korytkowski y Ojeda, 1968).

Caracterización molecular mediante la técnica RAPD-PCR

Evaluación de la calidad del ADN

La calidad del ADN fue óptima, se registró valores en un rango de 1,714 a 2 mediante espectrofotometría; la concentración más alta del ADN fue de 14,35  $\mu\text{l}/\text{ml}$  y la más baja fue de 8,15  $\mu\text{l}/\text{ml}$ . Por electroforesis se observa bandas definidas, visibles, con poco arrastre y buena resolución, lo que demuestra la integridad del ADN (Figura 3).



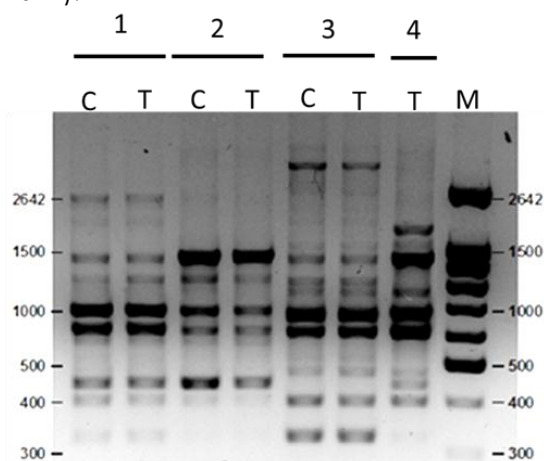


**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de las muestras del ADN genómico extraído por el método empleado con *A. distincta*. Las bandas 4, 5 y 7 corresponden a la muestra de la cabeza y el resto corresponde al tórax y parte del abdomen.

RAPD-PCR: Amplificación con los primer OPC 10 y OPC 05

En la figura 4, se observa los productos de amplificación de muestras del ADN de individuos de *A. distincta* con los primer OPC 10 y OPC 05. Los perfiles de bandas son coincidentes entre las muestras del ADN de la cabeza y tórax de cada individuo.

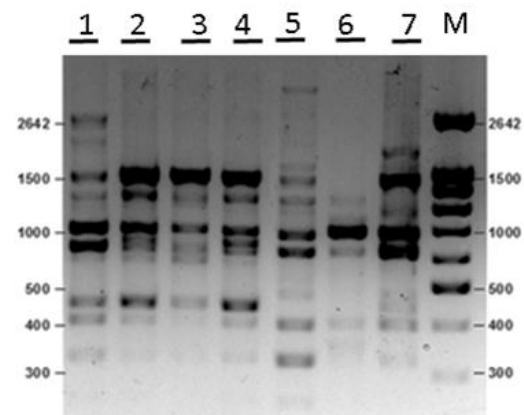
Con el tejido del tórax se tuvo mayor concentración de ADN que en el extracto de ADN de la cabeza. El tejido para la extracción de ADN de la cabeza se obtuvo mediante la disección directa, a diferencia del tejido del tórax, que requirió disección y eliminación de órganos internos. Pecina *et al.* (2009) extrajeron ADN de *A. ludens* tomando como muestra el imago completo; en otras especies del género *Anastrepha* han utilizado larvas del tercer estadio (Gómez-Viveros *et al.*, 2008) y para insectos en general, recomiendan utilizar el tórax de insectos grandes para la extracción de ADN (Christudhas y Mathai, 2014).



**Figura 4.** Productos de amplificación por la técnica de RAPD-PCR de las muestras del ADN genómico extraído de *A. distincta*, obtenido con el iniciador OPC 10. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden al ADN de la cabeza y el resto al ADN del tórax con parte del abdomen, carril 9 marcador de peso molecular DNA 100 bp.

Cuando se utilice el tórax como muestra, se debe tener cuidado de eliminar el tubo digestivo, para evitar amplificaciones que no correspondan al genoma del individuo objetivo, dado que los cebadores arbitrarios de la prueba RAPD no presentan especificidad alélica.

El número de loci se determinó teniendo en cuenta solo las bandas con mayor nitidez; 14 fragmentos del ADN fueron amplificados, en el rango de tamaño de 300 y 3000 pares de bases para OPC 10 y 200 a 3000 pares de bases para OPC 05. Se reporta 10 loci polimórficos y 4 monomórficos para el marcador OPC 10, y para el OPC 05 se reporta 11 loci polimórficos y 3 monomórficos. Los perfiles genéticos de los individuos son diferentes entre sí (Figura 5). Gómez-Viveros *et al.* (2008) con el primer OPC 05 reportaron 4 fragmentos específicos para *A. ludens*, 9 para *A. oblicua*, y 25 para *A. striata*, mientras que con OPC-10 reportaron 15 fragmentos para *A. ludens*, 6 para *A. oblicua*, y 15 para *A. striata*.



**Figura 5.** Productos de amplificación por la técnica de RAPD-PCR de las muestras del ADN genómico extraído de *A. distincta* obtenido con el iniciador OPC 05, carril 9 marcador de peso molecular DNA 100 bp.

Otro caso de alta diversidad genética existente en los insectos es explicado por la variación de exones e intrones de las secuencias codificantes de los receptores de rianodina e inositol 1,4,5-trifosfato, se reporta desde 12 hasta 110 exones entre las especies de insectos, por ejemplo, en *Ceratitis capitata* se reporta 31 exones y en *Locustra migratoria* 103 exones; en general alta variación específica, aun cuando la homología proteínica es relativamente alta (Trocza *et al.*, 2018).

El alto grado de polimorfismo que se reporta en la presente investigación constituye otra evidencia de la gran diversidad que podría existir entre individuos de una población y podría explicar la gran capacidad de adaptación y supervivencia.

## CONCLUSIONES

Se confirma los valores cualitativos y métricos de los caracteres taxonómicos descritos para *A. distincta* y los productos RAPD con los OPC 05 y OPC 10 presentan un alto grado de variación genética, se observó 10 loci polimórficos y 4, monomórficos, en tamaños de ADN de 300 y 3000 pares de bases para OPC 10, y 3 loci monomórficos y 11 polimórficos, de 200 a 3000 pares de bases para OPC 05. Los marcadores estudiados son informativos para estudios de diferenciación genética de poblacionales de *A. distincta*, información importante para evaluar estrategias de control biológico o químico.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Sr. Antonio Sánchez y Sra. Yoli Tuesta por el apoyo en la recolección de la muestra y a la Srta. Blga. Melissa Santa Cruz por su colaboración en el manejo de muestras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asgar, U.; Faheem M.M.; Anwar, F.; Javed, A.; Raza, A. 2015. DNA extraction from Insects by using different techniques: A Review. *Advances in Entomology* 3: 132-138.
- Barr, N.B.; Ruiz-Arce, R.; Farris, R.E.; Gomes, S.J.; Lima, K.M.; Siqueira, D.V.; Ronchi-Teles, B.; Kerr, P.H.; Norrbom, A.L.; Nolasco, N.; Thomas, D.B. 2018. Identifying *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) Species using DNA Barcodes. *Journal of Economic Entomology* 111(1): 405-421.
- Basso, A.A.; Sonvico, A.; Quesada, L.; Manso, F. 2003. Karyotypic and molecular identification of laboratory of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1237-1244.
- Caraballo, J. 2001. Diagnóstico y clave pictórica para las especies del género *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) de importancia económica en Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana* 16(3): 157-164.
- Cheung, W.; Hubert, N.; Landry, B. 1993. A simple and rapid DNA extraction method for plant, animal, and insects suitable for RAPD and other PCR analysis. *PCR. Methods and Applications* 3: 69-70.
- Christudhas, A.; Mathai, M. 2014. Genetic variation of a migratory dragon fly characterized with random DNA markers. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2(2): 182-184.
- Figueiredo J.V.A.; Perondini, A.L.P.; Selivon, D. 2017. Patrones de la estructura interna del corión en los huevos de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Estructura y desarrollo de artrópodos* 46(2): 236-245.
- Gómez-Viveros, S.; Pinto, V.M.; Valadéz-Moctezuma E.; Núñez-Colín, A. 2008. Diferenciación molecular de larvas de tres especies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) de importancia económica en México. *Folia Entomológica. Mexicana* 47(3): 113-124.
- Gordillo L.N.A.; Pizarro, S.F.P. 2016. Monitoreo de las Especies y Hospederos Alternativos de los Géneros *Anastrepha* y *Ceratitidis* en los Cantones Gualaceo, Chodeleg y Sig Sig de la Provincia del Azuay. Tesis de Título. Universidad de Cuenca. Ecuador.
- Hernández-Ortiz, V.; Canal, N.A.; Tigrero, J.O.; Ruíz-Hurtado, F.M.; Dzul-Cauich, J.F. 2015. Taxonomy and phenotypic relationships of the *Anastrepha fraterculus* complex in the Meso-American and Pacific Neotropical dominions (Diptera, Tephritidae). In: De Meyer, M., Clarke, A.R., Hendrichs, J. (Eds.) Resolution of cryptic species complexes of Tephritidae pests to enhance SIT application and Facilitate international trade. *Zoo Keys* 540: 75-124.
- Khan, S.U.; Naz, S.; Reema, R.; Naeem, R. 2013. Genetic Fingerprinting of local Turmeric Genotypes using RAPDs. *Pakistan Journal of Botany* 45: 339-346.
- Korytkowski, C.A. 2001. Situación actual del género *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) en el Perú. *Revista. Peruana de Entomología* 42: 97-158.
- Korytkowski, C.A.; Ojeda P.D. 1968. Especies del género *Anastrepha* Schiner 1868 en el noroeste peruano. *Revista. Peruana de Entomología* 11(1): 32-70.
- Marangoni, S.; Raga, A.; De Sousa, F.M. 2013. Moscas-Das-Frutas (Diptera: Tephritidae) na região de President Prudent, SP. *Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegocios, Instituto de Biológico* 16: 1-18.
- Marigorda C.G.P. 2014. Ciclo biológico de *Anastrepha distincta* "mosca del pacaé" greene, 1934 (Diptera: Tephritidae), en condiciones de laboratorio. Tesis de Título. Universidad Nacional de Piura, Piura. Perú. 102 pp.
- Marín M.; H.D. 2017. Variabilidad molecular y taxonomía de larvas de moscas de la fruta *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) asociadas a tres frutales en tres zonas de vida en Antioquia. Tesis de Título, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Colombia. 176 pp.
- Martínez-Alava, J.O. 2007. Nuevos registros en el género *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) para Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 33 (1): 36-42.
- Nolasco, N.; Iannacone, J. 2008. Fluctuación estacional de moscas de la fruta *Anastrepha* spp. y *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) en trampas McPhail en Piura y en Ica, Perú. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 24(3): 33-44.
- Norrbom, A.L.; Carroll, L.E.; Thompson, F.C.; White, M.; Freidberg, A.; Thompson, F.C. 1999. Fruit Fly Expert Identification System and Systematic Information Database. *Myia* 9: 65-251.

- Norbom, A.L.; Rodríguez, G.J.; Steck, B.A.; Sutton; Nolazco, N. 2015. New species and host plants of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) primarily from Peru and Bolivia. *Zootaxa* 4041: 1–94.
- Pecina Q.V.; López A.J I.; Loera G.J. ; Rull, J.; Rosales R.E.; Cortez M.E.; Hernández D.S.; Mayek P.N.; Aluja S.M. 2009. Genetic differences between *Anastrepha ludens*(Loew) populations stemming from a native and an exotic host in New Mexico. *Agricultura Técnica en México* 35(3): 323-331.
- Pinto, D.N.; João Z.M.; Monoya, P.; Carvalho, I.R.; Nava, D.E. 2018. Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. *Crop Protection* 112: 187-200.
- Shi, X.; Lawrence, P.Q. 1999. An embryonic cell line from the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*(Diptera: Tephritidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Animal* 35(1): 12-14.
- Skoda, S.R.; Figarola, J.L.; Pornkulwat, S.; Foster, J.E. 2013. Inter- and intraspecific identification of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax*, using random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Journal of Insect Science* 3: 13-76.
- Trocza, B.J.; Richardson, E.; Homem, R.A.; Emyr D., T.G. 2018. An analysis of variability in genome organization of intracellular calcium release channels across insect orders. *Gene* 670: 70-86.
- Vilatuña R.J.E.; Sandoval, L.D.P.; Tigrero, S.J.O. 2010. Manejo y control de moscas de la fruta. AGROCALIDAD, Quito, Ecuador. Disponible en <http://docplayer.es/36900710-Manejo-y-control-de-moscas-de-la-fruta-jose-e-vilatuna-r-david-p-sandoval-l-juan-o-tigrero-s.html>.
- Vilatuña, J.; Valenzuela, P.; Bolaños, J.; Hidalgo, R.; Mariño, A. 2016. Hospederos de moscas de la fruta *Anastrepha* spp. y *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en Ecuador. *Revista Científica Ecuatoriana* 3: 52-57.