

Tesis Doctoral

Genética y citogenética de la determinación del sexo en *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Braconidae)

Carabajal Paladino, Leonela Z.

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carabajal Paladino, Leonela Z.. (2011). Genética y citogenética de la determinación del sexo en *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Braconidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Carabajal Paladino, Leonela Z.. "Genética y citogenética de la determinación del sexo en *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Braconidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**GENÉTICA Y CITOGENÉTICA DE LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN
Diachasmimorpha longicaudata (HYMENOPTERA, BRACONIDAE)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Leonela Z. Carabajal Paladino

Directores de Tesis: Dra. Alba G. Papeschi
Dr. Jorge L. Cladera
Dra. María José Bressa

Consejero de Estudios: Dra. María Isabel Remis

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica,
Instituto de Genética "Ewald A. Favret", INTA, Castelar.

Buenos Aires, 2011

GENÉTICA Y CITOGENÉTICA DE LA DETERMINACIÓN DEL SEXO EN *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA, BRACONIDAE)

El parasitoide braconídeo *Diachasmimorpha longicaudata* es ampliamente utilizado como controlador biológico de moscas de los frutos; sin embargo, es escaso el conocimiento disponible sobre su genética. A fin de aportar información y mejorar su cría masiva, se estudió su sistema de determinación del sexo mediante la realización de cruzamientos de alta y baja endogamia, utilizando herramientas de citogenética para determinar el nivel de ploidía de la descendencia. Asimismo, se analizó su espermatogénesis y su cariotipo en detalle, realizando aportes a la Teoría de Interacción Mínima, desarrollada para el estudio de la evolución del cariotipo en Hymenoptera.

En este parasitoide el sexo se determina por haplodiploidía (machos haploides, hembras diploides), pero en condiciones de alta endogamia ocurre un sesgo significativo de la proporción de sexos hacia machos, debido a la generación de machos diploides. El sexo estaría determinado por el estado de un promedio de tres loci no ligados. Los individuos homocigotas para los loci sexuales se desarrollan en machos diploides. Esta información permitirá mejorar los protocolos de cría masiva de la especie, tratando de minimizar el nivel de endogamia a fin de evitar un incremento en la producción de machos.

El estudio citogenético permitió corroborar el número cromosómico descripto previamente. Se analizó la cantidad, composición y distribución de la heterocromatina constitutiva, se mapearon los “clusters” de genes ribosomales y se determinó la cantidad de “clusters” activos. La información obtenida permitió aportar más evidencias a favor de la Teoría de Interacción Mínima.

Palabras clave: *Diachasmimorpha longicaudata*, determinación del sexo, haplodiploidía, citogenética, Teoría de Interacción Mínima.

GENETICS AND CYTOGENETICS OF SEX DETERMINATION IN *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA, BRACONIDAE)

Diachasmimorpha longicaudata is a braconid parasitoid widely used as biological control agent against fruit flies. In spite of its importance, little is known about its genetics. Different aspects were studied in order to provide more information and to optimize its massive production. Its sex determination system was analyzed using inbred and outbred crosses, and cytogenetic tools to analyze the ploidy level of the descendants. Also its spermatogenesis and karyotype were analyzed in detail, contributing to the Minimum Interaction Theory proposed for the study of karyotype evolution in Hymenoptera.

Sex is determined by haplodiploidy (males are haploid, females are diploid), but under inbreeding a significant bias towards male progeny is observed due to the generation of diploid males. Sex is presumably determined by a mean of three independent loci. Homozigotes for the sex loci develop into diploid males. In order to avoid an increment in male production, this information would be useful to improve the protocols of massive production of this species, regarding to minimizing the inbreeding levels.

The cytogenetic study allowed the corroboration of the chromosome number of the species. The amount, composition and distribution of constitutive heterochromatin were analyzed. The ribosomal gene clusters were located and the quantity of active sites was determined. The obtained information gave more evidence in favor of the Minimum Interaction Theory.

Keywords: *Diachasmimorpha longicaudata*, sex determination, haplodiploidy, cytogenetic, Minimum Interaction Theory.

Índice

	Página
Agradecimientos.....	1
Dedicatoria	2
Introducción General	
Características biológicas del orden Hymenoptera	4
Importancia agroeconómica del orden Hymenoptera.....	5
Biología de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae)	6
Importancia agroeconómica de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae).....	8
Relevancia del estudio genético y citogenético de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae).....	9
Determinación del sexo	
¿Qué es la determinación del sexo?	12
Mecanismos de determinación del sexo en insectos	12
Mecanismos de determinación del sexo en Hymenoptera.....	14
Mecanismo de determinación del sexo por alelos complementarios en Hymenoptera	17
Experimentos para el estudio del modelo de determinación del sexo por alelos complementarios.....	20
Antecedentes citogenéticos en Hymenoptera	
Generalidades citogenéticas	22
Número, morfología y tamaño cromosómico	23
Cantidad y composición de la heterocromatina constitutiva.....	26
Cantidad y distribución de las regiones organizadoras nucleolares (NORs)	28
Comportamiento meiótico: oogénesis y espermatogénesis.....	29
Reordenamientos cromosómicos	31
Evolución del cariotipo.....	32
Antecedentes sobre la citogenética de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	32
Objetivos	
Objetivos	35
Materiales y Métodos	
Material experimental.....	37
ENSAYO 1: Estudio de la proporción de sexos secundaria y de la tasa de mortalidad en líneas de alta endogamia, generadas a partir del cruzamiento de una hembra virgen y su hijo	37
ENSAYO 1.1 Obtención de individuos vírgenes.....	37
ENSAYO 1.2 Establecimiento de las líneas.....	37
ENSAYO 1.3 Controles exogámicos	38
ENSAYO 1.4 Análisis estadístico	38
ENSAYO 2: Verificación de la existencia de machos diploides mediante recuento cromosómico en hijos descendientes de cruzamientos madre por hijo	39
ENSAYO 2.1 Establecimiento de los cruzamientos.....	39

ENSAYO 2.2 Preparaciones cromosómicas.....	39
ENSAYO 2.3 Análisis cromosómico de los descendientes	40
ENSAYO 2.4 Tinción con el fluorocromo 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	40
ENSAYO 2.5 Análisis estadístico	40
ENSAYO 3: Descripción del cariotipo por las técnicas de bandas C, impregnación argéntica (bandas AgNOR), bandas secuenciales fluorescentes (DAPI/CMA ₃) y de hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) con una sonda específica de ADN ribosomal (ADNr)	41
ENSAYO 3.1 Bandas C.....	41
ENSAYO 3.2 Impregnación argéntica o bandas AgNOR.....	41
ENSAYO 3.3 Bandas fluorescentes DAPI/CMA ₃	41
ENSAYO 3.4 Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) con ADNr.....	42
ENSAYO 3.4.1 Desnaturalización de la sonda e hibridación	43
ENSAYO 3.4.2 Pretratamiento de las preparaciones cromosómicas y desnaturalización.....	43
ENSAYO 3.4.3 Hibridización	43
ENSAYO 3.4.4 Lavados.....	44
ENSAYO 3.4.5 Detección de la sonda (en oscuridad, luz roja)	44
ENSAYO 3.4.6 Tinción con DAPI a 25 °C en baño termostatzado con agitación	44
ENSAYO 3.5 Captura de imágenes	45
ENSAYO 4: Análisis del comportamiento cromosómico durante la meiosis en machos y hembras, utilizando la heterocromatina constitutiva como marcador citogenético	45
ENSAYO 4.1 Preparaciones cromosómicas.....	45
ENSAYO 4.2 Bandas C.....	45
ENSAYO 4.3 Captura de imágenes	45
ENSAYO 5: Estudio de la espermatogénesis en la especie.....	45
ENSAYO 5.1 Realización de las preparaciones cromosómicas.....	45
ENSAYO 5.2 Captura de imágenes	46
Resultados	
Estudio de la proporción de sexos secundaria en líneas de alta endogamia, generadas a partir del cruzamiento de una hembra virgen y su hijo (ENSAYO 1).....	48
Verificación de la existencia de machos diploides mediante recuento cromosómico en hijos descendientes de cruzamientos madre por hijo (ENSAYO 2).....	49
Descripción del cariotipo de <i>D. longicaudata</i> por las técnicas de bandas C, impregnación argéntica (AgNOR), bandas secuenciales fluorescentes (DAPI/CMA ₃) y de hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) con una sonda específica de ADN ribosomal (ADNr) (ENSAYO 3)	50
ENSAYO 3.1 Bandas C.....	50
ENSAYO 3.2 Impregnación argéntica o bandas AgNOR.....	52
ENSAYO 3.3 Bandas fluorescentes DAPI/CMA ₃	53
ENSAYO 3.4 Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) con ADNr.....	54

Análisis del comportamiento cromosómico durante la meiosis en machos y hembras, utilizando la heterocromatina constitutiva como marcador citogenético (ENSAYO 4)	55
Estudio de la espermatogénesis en la especie (ENSAYO 5).....	56
Discusión	
Determinación del sexo en <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	59
Análisis citogenético de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i>	61
Número cromosómico.....	61
Contenido y composición de la heterocromatina constitutiva.....	62
Distribución de los “clusters” de genes ribosomales	63
Gametogénesis	64
Aportes de la información citogenética obtenida en <i>D. longicaudata</i> para el estudio de la evolución del cariotipo en Parasítica	65
Conclusiones	68
Anexo Tablas	
Tabla 1.....	70
Tabla 2.....	71
Tabla 3.....	72
Tabla 4.....	82
Tabla 5.....	83
Tabla 6.....	84
Tabla 7.....	85
Anexo Soluciones	
0,1x SSC, 2x SSC, 4x SSC.....	87
20x SSC	87
Buffer McIlvaine pH7	87
Buffer PBS (Fosfato) 1x.....	87
Buffer TBE (Tris Borato) 5x	87
CMA ₃	88
EDTA (Etilen-diamino-tetraacetato de disodio) 0,5 M pH8.....	88
Hematoxilina férrica acética.....	88
Solución Denhart 50x.....	88
Solución fisiológica.....	88
Solución hipotónica.....	89
Bibliografía	91

Agradecimientos

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo en el Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica del Instituto de Genética “Ewald A. Favret”, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar y en el Laboratorio de Citogenética y Evolución del Departamento de Ecología, Genética y Evolución, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Quisiera agradecer a los directores de ambos laboratorios por brindarme un lugar y materiales para desarrollar mi investigación, y a los miembros de los mismos por recibirme cálidamente.

Las siguientes Instituciones han contribuido a la realización de esta Tesis a través de su ayuda económica: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Universidad de Buenos Aires (UBA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA).

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mis Directores, Dra. Alba Papeschi por recibirme en su laboratorio, abrirme los ojos a un campo que no había explorado con anterioridad, por ser una inspiración y un modelo a seguir. Dr. Jorge Cladera, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y haberme confiado un tema tan interesante. Dra. María José Bressa por compartir sus conocimientos prácticos conmigo y hacerse cargo de mí en un momento de gran tristeza. A los tres, gracias por guiarme, compartir su sabiduría, confiar en mí, tenerme paciencia o presionarme según las circunstancias, y formarme como profesional y como persona.

Agradezco a todos aquellos que colaboraron durante el diseño de los experimentos y el desarrollo de los mismos, Georgina Poggio por ser mi compañera durante la realización de las distintas técnicas de bandas e hibridación *in situ*, Silvia Lanzavecchia por sus aportes sobre determinación del sexo y el desarrollo de la sonda de ADN ribosomal, Claudia Conte por la generación de las sondas empleadas, Marianela Juri y Luciana Fueyo Sánchez por su colaboración durante la realización de los cruzamientos, María Inés Pigozzi por transmitirme sus conocimientos sobre la técnica de impregnación argéntica.

También quisiera agradecer a mi familia, sin cuyo apoyo no hubiera podido llegar a este momento, a mis padres, mi hermano, Juan (que se incorporó durante la última etapa, soportando el stress final), a mi Bela, mis tías y tíos, mis primos y primas, y a mi ahijada.

No quisiera dejar de mencionar a mis compañeros y amigos del trabajo y de la vida, que siempre me ayudaron a tratar de mantener el espíritu alto: Ale, Alejandra, Ceci, Chechu, Clarita, Clau, Diego, Dominga, Eduardo, Faby, Flavia, Francisco, Geíto, Guille, Laura, Lety, Lore, Mariana, Marianela, Marina, Mery, Mónica, Silvia, Patricia y Zule.

Gracias a todos los que en mayor o menor medida me acompañaron y apoyaron durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, a los que me instaron a seguir adelante cuando quise bajar los brazos, y por sobre todo gracias a los que me ayudaron a superar el enorme golpe que significó la pérdida de una de mis guías.

A mi familia y a Alba

INTRODUCCIÓN GENERAL

- **Características biológicas del orden Hymenoptera**

Los insectos constituyen aproximadamente la mitad de todos los organismos vivientes y su impacto en los ecosistemas terrestres es mayor que el de cualquier otro grupo de animales (Lasalle & Gauld 1991). Hymenoptera es uno de los cuatro órdenes megadiversos de insectos junto a Coleoptera, Diptera y Lepidoptera (Whitfield 1998) presentando entre 115.000 y 199.000 especies (Fernández 2006) distribuidas entre 79 (Hanson & Gauld 1995) y 99 (Goulet & Huber 1993) familias.

El orden Hymenoptera es un grupo altamente característico y sus atributos más notables son: un ciclo de vida holometábolo (huevo-larva-pupa-adulto), dos pares de alas membranosas transparentes o translúcidas en el adulto, siendo las posteriores más pequeñas que las anteriores), un aparato bucal de tipo masticador, la presencia de un ovipositor típico y homologado al de los insectos más primitivos (único entre los holometábolos) y una tagmatización particular, lo que dificulta relacionarlos claramente con el resto de los órdenes de holometábolos. En cuanto a su forma de vida, existen muchas diferencias dentro del grupo, encontrándose tanto especies parásitas como de vida libre (Martínez 2009).

Las especies de Hymenoptera se dividen en dos subórdenes: Symphyta y Apocrita. El primero se caracteriza por la falta de un estrechamiento entre el abdomen y el tórax, llamado "cintura", las larvas de tipo eruciformes, como las de los lepidópteros pero sólo con un par de ocelos y, en general, con más de 5 pares de falsas patas. El segundo contiene la mayoría de los Hymenoptera, y se caracteriza por tener una "cintura" que separa los dos primeros segmentos del abdomen, el primero de los cuales está fusionado al tórax, las larvas son ápodas y se crían en un nido o como parásitos de un huésped (Nieves-Aldrey & Fontal-Cazalla 1999).

Los apócritos se dividen tradicionalmente en dos grupos, Aculeata y Parasítica. El grupo Aculeata incluye las especies en las cuales el ovipositor de la hembra se transforma en un aguijón, por ejemplo las hormigas, las abejas y las avispas; los himenópteros del grupo Parasítica incluyen las especies parásitas de otros insectos, que se comportan como parásitos protaleanos, i.e. sólo las formas larvales son parásitas mientras que el adulto es de vida libre. A estas especies de himenópteros se las conoce como "parasitoides", término que hace referencia a que el ciclo vital de estos organismos usualmente implica la muerte de su hospedador, que generalmente es aproximadamente del mismo tamaño que el parasitoide y perteneciente al mismo taxón (Martínez 2009).

La biología de los himenópteros parasitoides presenta muchas variantes y, de acuerdo al modo en que interactúan con los hospedadores y con otros parasitoides, se clasifican en:

- Ectoparasitoides/endoparasitoides: las formas ectoparasíticas se desarrollan alimentándose de los tejidos de su hospedador desde el exterior, mientras que los endoparasitoides se desarrollan dentro de su hospedador. Sin embargo, estos términos no son absolutos ya que a veces una misma especie puede comportarse como endoparasitoide durante los primeros momentos del desarrollo larval, luego salir del hospedador y continuar alimentándose de él externamente (Debach & Rosen 1991).

- Idiobiontes/koinobiontes: esta distinción se refiere al efecto que el parasitismo tiene sobre el ciclo vital del hospedador. Los parasitoides idiobiontes inyectan algún tipo de veneno al momento de la oviposición que afecta significativamente el desarrollo ulterior del

hospedador. Típicamente esta estrategia está asociada a ectoparasitoides. Por el contrario, los parasitoides koinobiontes, también llamados cenobiontes, no inyectarían ninguna sustancia que impida el “normal” desarrollo del hospedador. El hospedador se alimenta y crece paralelamente con su parasitoide, que usualmente es interno y, finalmente, su muerte se desencadena cuando la larva del parasitoide ha consumido masivamente sus órganos vitales (Debach & Rosen 1991).

- Solitarios/gregarios: tanto ectoparasitoides como endoparasitoides pueden ser solitarios, cuando una larva se desarrolla individualmente en el hospedador, o gregarios, cuando varias larvas se desarrollan a expensas de un individuo (Martínez 2009).

- De huevo/de larva/de pupa/de adulto: según el estado del hospedero atacado (huevo, larva, pupa o adulto). Algunos grupos son muy uniformes con respecto al estado del hospedador atacado. En general, hay pocos parasitoides del estado adulto de hospederos holometábolos, en cambio, son muy comunes los parasitoides de larvas (Hanson 1990).

Dentro del grupo Parasítica se incluyen las superfamilias Ceraphronoidea, Chalcidoidea, Cynipoidea, Evanioidea, Ichneumonoidea, Megalyroidea, Mymarommatoidea (a veces incluida en Serphitoidea), Platygastroidea, Proctotrupeoidea, Serphitoidea (fósil), Stephanoidea y Trigonoidea. De interés particular para la presente Tesis Doctoral, es la superfamilia Ichneumonoidea, que incluye sólo dos familias: Ichneumonidae y Braconidae. En esta superfamilia se han descrito más de 80.000 especies, siendo la gran mayoría controladores biológicos de especies nocivas de insectos. Muchas de estas especies de parasitoides presentan un polyadenovirus asociado para que al poner sus huevos en el interior del hospedador, el sistema inmunitario de éste no lo rechace (Martínez 2009).

La familia Braconidae es la segunda del orden Hymenoptera en lo que respecta a la diversidad específica (Shaw 1995). Sus representantes pueden distinguirse por la siguiente combinación de caracteres:

- ala anterior con la vena 2m-cu (segunda vena recurrente) ausente, por lo que la segunda celda discal se encuentra abierta;
- tergos II y III del metasoma fusionados;
- ala anterior con la vena Rs+M generalmente presente, separando la primera celda submarginal de la primera celda discal;
- ala posterior con la vena 1r-m basal respecto a la separación de las venas R1 y Rs (Martínez 2009).

- **Importancia agroeconómica del orden Hymenoptera**

Los himenópteros son componentes cruciales de los ecosistemas y su conservación es esencial por razones económicas y ecológicas; además, constituyen un grupo de estudio de gran interés ya que incluye especies perjudiciales y benéficas para el ser humano: especies plaga (i.e. hormigas), especies de gran relevancia por su desempeño como polinizadores (i.e. abejas, abejorros) y especies con potencial aplicación en el campo de la agro-tecnología (i.e. parasitoides). (Wilson 1987, Lasalle & Gauld 1993, Allen-Wardell et al. 1998, Kevan & Viana 2003).

La importancia de los himenópteros parasitoides queda evidenciada en el número de interacciones tróficas en las que participan, los efectos reguladores sobre las poblaciones de

hospedadores, la presencia de especies de notable importancia y el efecto cascada que su remoción podría provocar en un sistema. Se estima que las redes tróficas que involucran a plantas, insectos herbívoros y parasitoides incluyen aproximadamente a la mitad de los metazoos conocidos (Hawkins & Lawton 1987). Su potencial como reguladores de poblaciones de especies herbívoras es difícil de estimar, pero un indicador de su importancia puede ser el modo en que las poblaciones de insectos fitófagos se incrementan ante la remoción de los parasitoides (Lasalle & Gauld 1991). Los Hymenoptera Parasítica podrían regular indirectamente la estructura del ecosistema al regular el tamaño poblacional de ciertas especies de herbívoros (Lasalle & Gauld 1991).

Asimismo, los himenópteros parasitoides, y particularmente los braconídeos, han sido propuestos como bioindicadores para determinar el efecto que ha tenido el hombre sobre las comunidades naturales. La asociación estrecha entre parasitoides y hospedadores, especialmente aquellos parasitoides que han desarrollado estrategias especialistas, permitiría afirmar que son un estimador de la comunidad de insectos fitófagos (Delfín & Burgos 2000). A pesar de su potencial utilización como indicadores biológicos, su aplicación quedaría supeditada al conocimiento y estabilidad de la taxonomía del grupo y a la comprensión de la biología e historia de vida de los organismos involucrados (Pearson & Cassola 1992, Favila & Halffter 1997). En el caso de los parasitoides solitarios, los análisis se ven limitados debido a la dificultad para la cría del material en condiciones artificiales y para la captura de individuos a campo (Gokhman 2004).

Desde el punto de vista aplicado, los parasitoides del Orden Hymenoptera, constituyen un grupo muy importante de agentes de Control Biológico. Este conjunto de técnicas consideradas de bajo impacto ambiental, se utiliza con otras medidas biológicas, biotecnológicas, químicas y comportamentales a fin de minimizar el empleo de insecticidas para el control de poblaciones plaga. El Control Biológico se basa en la liberación de enemigos naturales que incluyen parasitoides, predadores, patógenos, antagonistas o competidores de la plaga, con el objeto de suprimirla y bajar su tamaño poblacional a densidades menos abundantes o por debajo del umbral de daño económico (DeBach 1964, van Driesche & Bellows 1996). En algunos casos las estimaciones realizadas sobre el capital que hubiese sido necesario invertir para alcanzar el efecto producido por los parasitoides alcanza cifras millonarias (Lasalle & Gauld 1991).

- **Biología de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae)**

Diachasmimorpha longicaudata (Figura 1) es un endoparásitoide koinobionte solitario de moscas plaga de los frutos. Esta especie es nativa de Malasia, India, Nueva Inglaterra, Borneo, Saipan y Filipinas (Bess 1961, Clausen et al. 1965). Las hembras adultas depositan sus huevos en estadios larvales tardíos de moscas de los frutos de los géneros *Bactrocera* (Macquart), *Anastrepha* (Schiner) y *Ceratitis* (Macleay) (Diptera, Tephritidae), aunque algunos estudios indican que pueden desarrollarse ocasionalmente en larvas



Figura 1. *Diachasmimorpha longicaudata*. Barra = 5 mm.

de otras especies de dípteros, como por ejemplo *Musca domestica* (Linnaeus) (Diptera, Muscidae) (Terán López 1983).

Su ciclo de vida incluye cuatro estados de desarrollo: huevo, larva (tres estadios), pupa y adulto (Figura 2) (Carabajal Paladino et al. 2010). Los tres primeros estados se desarrollan dentro del huésped, mientras que los individuos adultos son de vida libre (Pemberton & Willard 1918, Greany et al. 1976). La duración de los estados inmaduros, tanto en laboratorio como en campo, es dependiente de las condiciones de temperatura y humedad, así como de la edad de la larva hospedadora utilizada (Lawrence et al. 1976). En condiciones de laboratorio con temperaturas de 25 ± 1 °C, humedad de 50 - 70 / y fotoperíodos de 12 horas luz/oscuridad, la emergencia de los individuos adultos macho se produce alrededor de 15 días después de la oviposición, mientras que las hembras emergen 24 a 48 horas después (Carabajal Paladino et al. 2010).

Al ser una especie de comportamiento solitario, a partir de una larva hospedador se obtiene un espécimen de parasitoide, aunque se han registrado casos de superparasitismo, i.e. más de un huevo de parasitoide por hospedador (Greany et al. 1976).

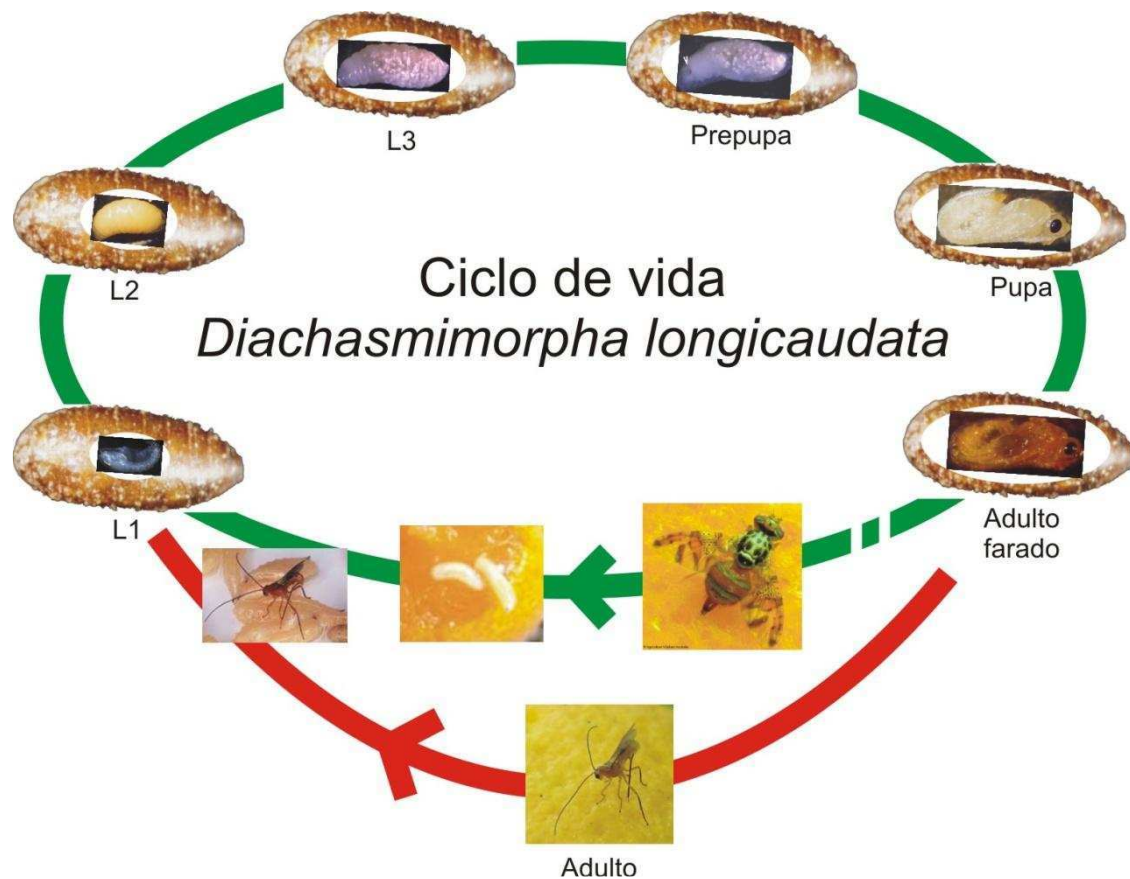


Figura 2. Ciclo de vida del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*.

La cópula se efectúa inmediatamente luego de la emergencia (Hagen 1953), es sumamente rápida, se efectúa en cuestión de segundos y existe la posibilidad de que la hembra copule con más de un macho (Martínez 1992). Por ello, la oviposición puede ocurrir inmediatamente después de la emergencia de los parasitoides adultos. Sin embargo, es más

frecuente que transcurran alrededor de 9 días desde la emergencia de los adultos hasta el inicio de la oviposición (Vargas et al. 2002, Viscarret et al. 2006a).

El parasitoide es atraído al lugar donde se encuentra el hospedador por la acción de sustancias volátiles, como acetaldehídos, que son emanadas de la fruta en descomposición por la acción de la larva hospedante (Greany et al. 1977); también se encontró que las frutas con apariencia de daño son preferidas por los parasitoides (Segura et al. 2004).

Las vibraciones producidas por los movimientos de la larva hospedador en el interior del fruto y los sonidos que ella produce durante su alimentación son considerados como claves/señales que utiliza el parasitoide para encontrar el lugar donde se ubica el huésped (Lawrence 1981). *Diachasmimorpha longicaudata* utiliza las antenas para localizar el lugar que ocupa la larva hospedante dentro de la fruta, y los mecanorreceptores ubicados en los tarsos de las patas anteriores para detectar a la larva en sí (Leyva et al. 1988).

Las pruebas que el parasitoide realiza con el ovipositor dan información acerca del estado fisiológico del hospedador, así como de su tamaño. La proporción de hormonas ecdisona y juvenil, ambas componentes de la hemolinfa de la larva hospedador, es un factor que el parasitoide utiliza como indicador para seleccionar el individuo adecuado (Martínez 1989). Asimismo, estas pruebas le indican a la hembra si la larva ya fue parasitada, para evitar el superparasitismo, i.e. colocar más de un huevo por hospedador (Lawrence 1982).

- **Importancia agroeconómica de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae)**

Diachasmimorpha longicaudata es un himenóptero braconídeo de importancia agroeconómica por ser ampliamente utilizado para el Control Biológico de moscas plaga de los frutos de la familia Tephritidae, que son causantes de enormes pérdidas económicas en todo el mundo (Sivinski 1996). Los fundamentos de su elección como agente controlador se basan en su fácil cría y manipulación, su rápida adaptación a los medios naturales donde es liberado (Marucci & Clancy 1950) y también a que posee un amplio rango de hospedadores. La capacidad de *D. longicaudata* de poder reproducirse tanto en *Ceratitis capitata* (Wiedemann) como en *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae) (Carvalho & Nascimento 2002), representa una ventaja muy significativa para controlar estas especies plaga de tefrítidos en áreas donde ambas especies coexisten; por ejemplo, en las regiones citrícolas del Norte y Centro de la Argentina (particularmente Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca) (Ovruski et al. 1999). Por otra parte, este parasitoide ha demostrado ser efectivo tanto en regiones tropicales (Cancino et al. 1995, Sivinski 1996) como en ambientes áridos (Greany et al. 1976).

Este parasitoide se cría masivamente en México (Cancino 1998), Guatemala (Sivinsky 1996, Montoya et al. 2000), Costa Rica (Carro et al. 2001), Perú (SENASA – Perú 1999) y Brasil (Carvalho & Nascimento 2002), siendo la especie de himenóptero parasitoide más ampliamente utilizada en la actualidad en los programas de Control Biológico contra las moscas de los frutos en América latina. Además, se ha establecido exitosamente en la mayoría de los países en los que se introdujo: Colombia (Wong & Ramadan 1992), Costa Rica (Jirón & Mesón 1989), Guatemala (Eskafi 1990), El Salvador (Ovruski et al. 1996), México (Cancino Díaz & Enkerlin 1992), Nicaragua, Trinidad, Estados Unidos (Florida) (Baranowsky et al. 1993), Venezuela (Ovruski et al. 2000) y Brasil (Carvalho & Nascimento 2002).

A partir de 1960, *D. longicaudata* fue introducida en varias oportunidades en nuestro país, aunque su liberación a campo no fue evaluada de manera adecuada (Ovruski & Fidalgo 1994). En 1961 el Ministerio de Agricultura y Ganadería junto con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) introdujeron a *D. longicaudata* desde México. Una cantidad de 100.000 individuos fue liberada en el noreste de las provincias de Misiones (Montecarlo) y Entre Ríos (Concordia) y en el noroeste de las provincias de Tucumán (San Miguel de Tucumán) y Jujuy (Calilegua). También algunos ejemplares fueron liberados en el centro del país en Córdoba (Cruz del Eje y Yacanto) (Turica 1968). Nuevas liberaciones fueron realizadas en Tucumán en 1977 y en 1986 (Ovruski & Fidalgo 1994). A principios de septiembre del año 1999 fue nuevamente introducido a fin de reanudar el empleo de enemigos naturales contra *C. capitata* y *A. fraterculus*. Desde ese momento hasta el presente, esta especie parasitoide está siendo criada a nivel semimasivo en la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI) de San Miguel de Tucumán (provincia de Tucumán, Argentina) y en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF), INTA Castelar (provincia de Buenos Aires, Argentina) (Ovruski et al. 2003, Viscarret et al. 2006a, 2006b). En esa oportunidad el parasitoide se introdujo en nuestro país a través de un subsidio del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONCyT, Argentina) desde el Complejo Bioindustrial MOSCAMED-MOSCAFRUT (Metapa de Domínguez, Chiapas, México) (SENASA, Expte. n° 14054/98).

En relevamientos de parasitoides de moscas de los frutos realizados en Montecarlo (provincia de Misiones, Argentina) se registraron especímenes de *D. longicaudata*. El primer registro de esta especie data de marzo de 2000 y luego fue encontrado en febrero y marzo de 2001 y abril de 2002. Así, este parasitoide exótico se ha establecido en al menos una provincia argentina, aunque en pequeños números (alrededor de 1 / de parasitismo) (Schliserman et al. 2003).

Para un mejor aprovechamiento de la implementación de los programas de Control Biológico, son necesarios conocimientos teóricos y prácticos de las técnicas y de los organismos comúnmente utilizados (Ovruski et al. 1999). El conocimiento de la biología general de la especie criada experimentalmente es fundamental. Los estudios sobre la fisiología, el comportamiento y la genética constituyen una base esencial para el desarrollo y mantenimiento de una cría masiva (Cancino 1998).

- **Relevancia del estudio genético y citogenético de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae)**

La caracterización genética de *Diachasmimorpha longicaudata* como modelo de estudio representa una idea innovadora, al brindar información de interés para estudiar la evolución de los mecanismos de determinación del sexo en Hymenoptera, y para dirigir la producción masiva de especies de importancia económica, obteniendo un mayor rédito con su aplicación en el Control Biológico. Sin embargo, los estudios de genética molecular y de citogenética en Hymenoptera son relativamente escasos.

Diachasmimorpha longicaudata, a diferencia de otros parasitoides, demostró una fácil adaptabilidad a las condiciones de cría en laboratorio; su manipulación es sencilla, cuenta con una amplia variedad de hospedadores y puede soportar variaciones en las condiciones ambientales. En el contexto de cría artificial muestra una gran versatilidad en el manejo, permitiendo la realización de todo tipo de cruzamientos y la fundación de líneas de

determinadas características o en determinadas condiciones, a fin de desarrollar estudios genéticos y/o biológicos detallados. El hecho de contar con una provisión constante de individuos y en elevado número dentro del mismo lugar de trabajo garantiza la realización de diferentes clases de estudios (biológicos, genéticos, ecológicos, etc.) durante todo el año.

Las características anteriormente mencionadas permiten postular a *D. longicaudata* como organismo modelo para la realización de distintos análisis biológicos, que luego podrían ser transferidos a otras especies de parasitoides solitarios y cuya cría en condiciones artificiales está limitada. Asimismo, los estudios genéticos y citogenéticos realizados sobre esta especie permitirán mejorar su cría en biofábricas, i.e. plantas dedicadas a su producción masiva para su liberación en Control Biológico, ampliar la información disponible sobre su bionomía y tratar de dilucidar su mecanismo de determinación del sexo. La presente Tesis Doctoral contribuirá a profundizar el conocimiento sobre la familia Braconidae que cuenta con una gran cantidad de especies de importancia económica.

DETERMINACIÓN DEL SEXO

- **¿Qué es la determinación del sexo?**

La mayoría de los organismos eucariontes se reproducen sexualmente para mezclar su material genético y producir descendencia genéticamente diversa. Los machos y las hembras difieren en los niveles morfológicos, fisiológicos y de comportamiento. Este dimorfismo sexual es el resultado de la integración de dos procesos: la determinación del sexo y la diferenciación sexual (Normark 2003).

Por determinación del sexo se entiende al conjunto de factores y mecanismos genéticos que definen el carácter sexo de un individuo (Lacadena 1988). De este modo, la determinación del sexo se refiere al programa de desarrollo de un individuo que lo compromete hacia el camino femenino o masculino (Sánchez 2008). La decisión de si el cigoto se desarrollará en un macho o una hembra se hace de manera diferente en las especies. En principio, hay dos formas: i) la señal de la determinación sexual primaria es proporcionada por el medio ambiente (determinación ambiental del sexo), o ii) se determina genéticamente (determinación genética del sexo) (Vitková 2007).

La inmensa mayoría de los organismos eucariontes se basan en la determinación genética del sexo, donde un gen o varios genes son responsables de activar la vía de la determinación del sexo, lo cual se traduce en el desarrollo del sexo deseado, independientemente de las condiciones ambientales. Los genes que regulan este programa se denominan genes de determinación del sexo, y llevan a la diferenciación sexual a través de la regulación de la expresión de los genes de citodiferenciación sexual, que dan origen a la formación de estructuras sexualmente dimórficas que caracterizan a la hembra y al macho adultos (Sánchez 2008). En general, los genes de determinación del sexo están localizados en los cromosomas sexuales (Vitková 2007).

- **Mecanismos de determinación del sexo en insectos**

El reino animal posee una gran cantidad de mecanismos a través de los cuales se decide el género de un individuo, masculino o femenino (Bull 1983). Todos los tipos conocidos de mecanismos de determinación del sexo están representados en la clase Insecta (Sánchez 2008). Existen distintas maneras de analizar la forma en que se determina el sexo en este grupo de artrópodos, una de ellas se basa en el nivel de ploidía de los machos generados. Bajo este sistema de clasificación se pueden reconocer tres clases básicas de sistemas de determinación del sexo: aquellos donde los machos son diploides (diplodiploidía), aquellos donde los machos son haploides (haplodiploidía) y aquellos sin machos (telitoquia) (Normark 2003).

- **Diplodiploidía**

Cada individuo tiene dos padres y lleva un genoma diploide que consiste en los genomas haploides de cada padre. Cada individuo macho hereda un genoma haploide de su madre y uno de su padre, y ambos genomas tienen igual probabilidad de transmisión a través de su esperma. Este mecanismo es característico de la gran mayoría de las especies de insectos, siendo un sistema ancestral en todos los órdenes excepto Thysanoptera y Hemiptera (Normark 2003).

- Haplodiploidía

La haplodiploidía está en el límite entre la determinación del sexo ambiental y la determinación genética del sexo. Este mecanismo de determinación sexual es una característica bien conocida de Hymenoptera, aunque también está presente en Thysanoptera, algunos Homoptera, Coleoptera y Acari (revisado en Leather & Hardie 1995).

La determinación sexual por haplodiploidía no depende de la presencia de cromosomas sexuales, pero en ella los machos y las hembras tienen diferente constitución cromosómica (van Wilgenburg et al. 2006). En este caso, el sexo de la descendencia es controlado por la madre, que produce hembras diploides por fecundación o machos haploides generados por partenogénesis y mitosis (White 1973, Bull 1983, Vitková 2007).

La forma más conocida de haplodiploidía es la haplodiploidía arrenotóxica, en la que los machos se desarrollan a partir de huevos no fertilizados y sólo poseen el genoma heredado de su madre. Las hembras se desarrollan a partir de huevos fertilizados, por lo que presentan tanto el genoma paterno como el materno. Este mecanismo de determinación sexual también es denominado simplemente arrenotoquia, i.e. el nacimiento virginal de los machos, y está presente en los órdenes de insectos Thysanoptera, Hymenoptera, Hemiptera y Coleoptera (Normark 2003)

Además de la haplodiploidía arrenotóxica, hay otra clase de sistemas genéticos en la que los machos se desarrollan a partir de un cigoto que contiene un genoma haploide materno y un genoma haploide paterno, pero sólo el genoma materno se transmite a través de su espermatozoide. Este mecanismo de determinación sexual se llama sistema de eliminación de genoma paterno y se encuentra en Hemiptera, Coleoptera y Diptera (Herrick & Seger 1999, Normark 2003). El sistema de eliminación de genoma paterno es idéntico a la arrenotoquia en términos de la transmisión genética (Normark 2003).

- Telitoquia

En un sentido amplio, la telitoquia se refiere a los sistemas genéticos en los que las hembras transmiten sólo genes maternos y producen sólo hijas. Por lo tanto, abarca los sistemas que carecen por completo de los machos, i.e. partenogénesis telitoca, así como los sistemas más raros en los que el apareamiento con machos de una especie relacionada es necesario para iniciar el desarrollo, i.e. telitoquia esperma-dependiente (Normark 2003).

Las características principales de la telitoquia son: i) la eficiencia reproductiva, con poco o ningún malgasto de energía (Hamilton 1975) y ii) la falta de recombinación entre los genomas de diferentes individuos. La telitoquia ocurre con frecuencia en muchos grupos de organismos, pero es especialmente frecuente en los pequeños invertebrados terrestres y que habitan en agua dulce (Bell 1982, Suomalainen et al. 1987, Chaplin et al. 1994, Judson & Normark 1996). El gran número de linajes de insectos telitocos refleja este patrón (Normark 2003).

- Sistemas mixtos

Esta es una categoría muy heterogénea de los sistemas genéticos, que incluye a todos aquellos sistemas complejos en los que hay una alternancia (ya sea facultativa o cíclica) entre dos de los diferentes sistemas genéticos descritos previamente. A pesar de que machos diploides pueden ocurrir en altas frecuencias en las poblaciones haplodiploides (Krieger et al. 1999) y pueden ser fértiles (Roubik 2001), no se han encontrado sistemas de alternancia entre

diplo-diploidía y haplo-diploidía; en general es la telitoquia la que se alterna con cualquiera de ellos dos. Debido a que estos sistemas mixtos representan transiciones entre los sistemas genéticos, son potencialmente una fuente rica de información sobre la historia evolutiva de estas transiciones (Normark 2003).

- **Mecanismos de determinación del sexo en Hymenoptera**

El mecanismo característico de determinación del sexo en este orden es la haplo-diploidía, i.e. los machos son haploides, desarrollándose por partenogénesis de huevos no fertilizados, recibiendo un único conjunto de cromosomas maternos; y las hembras son diploides, provenientes de huevos fertilizados, presentando los dos juegos de cromosomas, maternos y paternos (Cook 1993, van Wilgenburg et al. 2006, Sánchez 2008). Las hembras arrenotóquicas suelen tener control sobre la fecundación mediante la liberación de los espermatozoides a un huevo en la oviposición y, facultativamente, pueden ajustar la proporción de sexos de su progenie (van Wilgenburg et al. 2006).

Las especies telitóquicas, compuestas enteramente de hembras, también ocurren pero son menos comunes (Slobodchiloff & Daly 1971, Luck et al. 1992). En las especies telitóquicas las hembras diploides se desarrollan por partenogénesis de óvulos no fertilizados y no hay machos (Slobodchiloff & Daly 1971, White 1973, Bull 1983, Luck et al. 1992). La distribución desigual taxonómica de la telitoquia es compatible con varios orígenes evolutivos independientes a partir de especies ancestrales arrenotóquicas (White 1973, Bull 1983).

La haplo-diploidía, con la consecuente ausencia de cromosomas sexuales, constituye un aspecto llamativo. Los genes recesivos deletéreos, que pueden quedar enmascarados en las hembras heterocigotas, se expresan en los machos haploides, siendo eliminados de la población (Bruckner 1978, Crozier 1985, Werren et al. 1993, Antolin 1999). Esta capacidad de purgar con relativa rapidez las mutaciones deletéreas hace que las Hymenoptera se consideren relativamente inmunes a los efectos de la endogamia (Werren 1993, Hedrick & Parker 1997, Luna & Hawkins 2004) reduciendo, teóricamente, los riesgos intrínsecos de extinción en comparación con las especies diplo-diploides (Zayed & Packer 2005). Sin embargo, la haplo-diploidía no resulta en una eliminación total de la carga mutacional (Werren 1993, Hedrick & Parker 1997), ya que se han predicho y observado niveles de depresión por endogamia en varias especies (Luna & Hawkins 2004).

A pesar de la generalización del sistema haplo-diplonte, en más de 60 especies se ha descrito la presencia de machos diploides (Heimpel & de Boer 2008), que suelen aparecer en poblaciones en condiciones de alta endogamia o de baja diversidad genética (de Boer et al. 2008). Los machos diploides pueden ser viables o inviables, estériles o fértiles (van Wilgenburg et al. 2006, de Boer et al. 2008). En cualquier circunstancia, los machos constituyen una carga genética para la población ya que provocan el desvío de la proporción de sexos hacia ellos al originarse a partir de huevos fecundados, a expensas del desarrollo de hembras reproductivas (Liebert et al. 2004, van Wilgenburg et al. 2006). La producción de machos diploides en himenópteros tiene una serie de consecuencias evolutivas importantes, entre las cuales pueden mencionarse la reducción del potencial de crecimiento de la población (Stouthamer et al. 1992) y el tamaño efectivo de la misma (Zayed 2004), lo cual incrementa el riesgo de extinción (Zayed & Packer 2005). En el caso de las especies criadas masivamente para Control Biológico, el desarrollo de machos diploides constituye una pérdida en la productividad y una

disminución en la efectividad de la liberación, porque son las hembras las que, fecundadas o no, ejercerán su acción sobre la plaga (Stouthamer et al. 1992). Por todo lo expuesto, se destaca la necesidad de estudiar el sistema de determinación del sexo en especies de importancia económica, ya que el conocimiento de sus bases permitiría, entre otras cosas, realizar un manejo apropiado de la población, para así mejorar su productividad.

El hecho de detectar machos diploides lleva a complejizar el mecanismo de determinación del sexo originalmente descrito como haplodiploidía, incorporando otros elementos. Distintos modelos del mecanismo genético de la haplodiploidía se han planteado para explicar la existencia de machos diploides y entre ellos pueden mencionarse: balance materno-cigótico (Beukeboom 1995), balance genético (Cunha & Kerr 1957), impronta genética o “imprinting” genético (Beukeboom 1995), determinación del sexo por fertilización (Dobson & Tanouye 1998), determinación del sexo por impronta genómica o “imprinting” genómico de efecto materno (Beukeboom et al. 2007) y determinación del sexo por alelos complementarios, ya sea por un locus como por múltiples loci (Snell 1935, Whiting 1939, 1943, Crozier 1971, 1977) (Tablas 1 y 2):

1) Balance materno-cigótico

El sexo del individuo está determinado por: i) el genoma de la madre, i.e. por genes de efecto materno cuyos productos estimulan el desarrollo de machos e inhiben la producción de hembras; ii) el genotipo del individuo, es decir genes de efecto cigótico; iii) alguna interacción entre estos componentes, de modo tal que, un complemento diploide inhibe satisfactoriamente el desarrollo de machos y produce hembras, mientras que un complemento haploide resulta en machos (Beukeboom 1995, Werren et al. 2002).

2) Balance genético

El sexo es determinado por una serie de genes masculinizantes (*m*) de efecto no acumulativo y una serie de genes feminizantes (*f*) de efecto acumulativo. Los efectos de los genes *m* son los mismos en individuos haploides y diploides y pueden ser representados como *M*, mientras que el efecto de los genes *f* será *F* en individuos haploides pero *2F* en los diploides (Cunha & Kerr 1957). El sexo se determina por la relación $2F > M > F$, de manera que los loci productores de machos son dominantes en individuos haploides, mientras que los productores de hembras lo son en organismos diploides y poliploides. Este modelo se observa, por ejemplo, en colonias de hormigas.

3) Impronta genética o “Imprinting” genético

Este modelo sugiere que no es la ploidía lo que determina el sexo, sino la presencia o ausencia de impronta genética en el genoma. En este modelo el genoma que es paterno en una generación, es materno en la siguiente (Haig 1998). En el genoma materno se asume una impronta genética específica del locus determinante de sexo (*S*), el cual se une a un producto (*P*) que está presente en el huevo o cigoto (Beukeboom 1995). Las hembras anulan el locus *S* durante la ovogénesis, de modo que no puede unirse a *P* y entonces los huevos lo llevan en estado inactivo (*Si*). Los machos no anulan el locus *S* y, por lo tanto, puede unirse a *P* transmitiéndolo en estado activo (*Sa*). Cuando *P* está unido a *S* se activan los genes que van a desarrollar el patrón femenino, mientras que cuando están separados, el individuo se desarrolla como macho. En el genoma paterno, durante el desarrollo de los machos, una porción de la línea germinal es modificada. Todos los huevos que posean sólo cromosomas

derivados de la madre se desarrollarán como machos y cualquier huevo que reciba el genoma paterno completo se desarrollará como hembra debido a la impronta genética (Mahowald & von Wettberg 1999).

4) Determinación del sexo por fertilización

El sexo del individuo está determinado por la fertilización y no por la ploidía del individuo. Así, embriones no fertilizados se desarrollan en machos y embriones fertilizados se desarrollan en hembras (Dobson & Tanouye 1998).

En ambos genomas se propone que uno o más loci tienen una impronta genética distinta en machos y hembras. Los huevos no fertilizados sólo poseen el genoma materno con la impronta materna y se desarrollan en machos. Los huevos fertilizados también poseen el genoma paterno con la impronta paterna, resultando en hembras (Poiré et al. 1993, Beukeboom 1995).

5) Determinación del sexo por impronta genómica o “imprinting” genómico de efecto materno

El sexo del individuo está determinado por el gen *zsd* (“zygotic sex determiner”), cuya actividad determina el desarrollo de hembras. Un gen de efecto materno (*msd*, “maternal sex determiner”) marca por “imprinting” el gen *zsd* durante la oogénesis, por lo que el alelo de *zsd* heredado por vía materna está inactivo en el cigoto. En consecuencia, los cigotos haploides se desarrollan en machos. Dado que el gen *msd* es de efecto materno, no está activo durante la espermatogénesis y, por lo tanto, el gen *zsd* heredado por vía paterna no está marcado y permanece activo y con capacidad de expresarse, dando como resultado el desarrollo de hembras (Beukeboom et al. 2007, Sánchez 2008).

6) Determinación del sexo por alelos complementarios

El modelo más extendido es el de alelos complementarios, que se observa en las sociedades de insectos matriarcales, como la abeja melífera, donde la reina tiene dotación diploide y produce gametos que pueden ser fecundados por machos para dar hembras, o no ser fecundados y originar machos (Whiting 1939, 1943, Beukeboom et al. 2007, Sánchez 2008).

En este modelo, el sexo masculino no es una propiedad de la haploidía por sí misma. Al realizar cruzamientos consanguíneos se descubre que se podían obtener machos diploides y, por ello, se establece que la feminidad es producida cuando en un locus determinado se produce la heterocigosis para cualquiera de las combinaciones posibles de una serie alélica. La hemicigosis del estado haploide y la homocigosis de los diploides consanguíneos son los que dan lugar a machos. En caso de varios loci con dos o más alelos, la heterocigosis en al menos un locus ya daría lugar a una hembra (Cook 1993, Sánchez 2008).

Este modelo presenta tres variantes:

a) Un locus con varios alelos (“SI-CSD: single locus complementary sex determination”): los individuos son hembras si llevan dos alelos diferentes (heterocigotas) y machos si llevan un alelo (hemicigotas) o más copias del mismo alelo (homocigotas) (Whiting 1939, 1943);

b) Varios loci con dos alelos cada uno (“MI-CSD: multilocus complementary sex determination”): se asumen varios loci sexuales y de la heterocigocidad en cualquiera de

ellos surgen hembras, mientras que si todos los loci son homocigotas o hemicigotas, los individuos se desarrollan como machos (Snell 1935);

c) Múltiples loci con varios alelos cada uno: es un modelo general que involucra “n” loci cada uno con “k” alelos sexuales (Crozier 1971, 1977).

- **Mecanismo de determinación del sexo por alelos complementarios en Hymenoptera**

Sobre la base de que los niveles de endogamia suelen ser altos en varias especies de Hymenoptera, es esperable que la carga genética asociada a la determinación del sexo por alelos complementarios conlleve a la selección de modos de determinación del sexo que no resulten en la costosa producción, desde el punto de vista genético, de machos diploides. Por otro lado, no todos los himenópteros presentan este modelo del mecanismo genético de la haplodiploidía. Sin embargo, estudios filogenéticos (Cook 1993, Cook & Crozier 1995) sugieren que el modelo del mecanismo de determinación del sexo por alelos complementarios sería ancestral en Hymenoptera (Cook & Crozier 1995) especialmente, en la superfamilia Ichneumonoidea y la familia Braconidae (Beukeboom et al. 2000). Aún más, el sistema de determinación por alelos complementarios en un locus simple, es considerado el modelo ancestral en el clado Aculeata-Ichneumonidea. No obstante, muy pocas especies de los grupos taxonómicos basales han sido analizadas para este sistema (Figura 3) (Beukeboom et al. 2007).

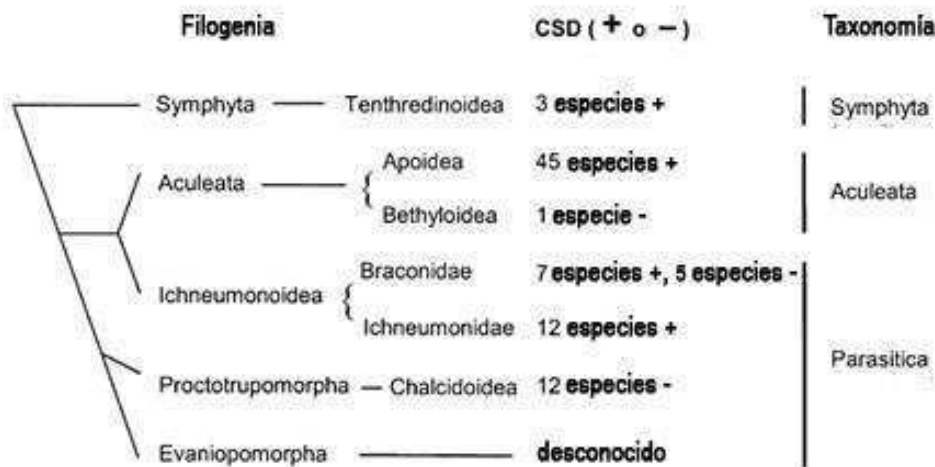


Figura 3. Distribución filogenética del modelo de determinación del sexo por alelos complementarios en Hymenoptera. Imagen presentada en Beukeboom y colaboradores (2007), a partir de datos de Cook & Crozier (1995) y van Wilgenburg y colaboradores (2006). Los signos + representan presencia y los signos - representan ausencia del modelo.

Este modelo de determinación sexual por alelos complementarios en un locus o varios loci, es el único que provee un modelo matemático que puede ser puesto a prueba mediante el estudio comparativo de la proporción de sexos en condiciones de endo y exogamia (Carabajal Paladino et al. 2003) y el análisis de la proporción de machos diploides producidos. La especie donde fue originalmente descrito es la avispa *Habrobracon juglandis* (= *Bracon hebetor*) (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae) (Whiting 1943). En *Apis mellifera*

(Linnaeus) (Hymenoptera, Apidae) se demostró que el sexo está determinado por alelos complementarios en un locus único y actualmente se cuenta con una descripción completa de la secuencia del gen determinante del sexo (*csd*, “complementary sex determinant”) y de sus variantes alélicas (Beye et al. 2003). El gen *csd*, se extiende por 9,3 Kb, tiene 9 exones y una estructura similar a los genes *transformer (tra)* de los dípteros. El producto de este gen es un transcrito de 1,5 Kb que codifica una proteína de 385 aminoácidos, rica en serina y arginina (Figura 4).

El gen *csd* se transcribe en ambos sexos y tiene una región altamente variable responsable de la variabilidad alélica que caracteriza al locus y da origen a diferentes isoformas de la proteína Csd. Según el modelo propuesto por Beye y colaboradores (2003) y Beye (2004) la heterocigocidad en los alelos produce dos isoformas funcionales de la proteína Csd, capaces de formar un complejo que determina el desarrollo femenino, mientras que la hemicigocidad o la homocigocidad genera una única isoforma de la proteína Csd que no puede generar un complejo funcional, y por lo tanto determina el desarrollo de machos.

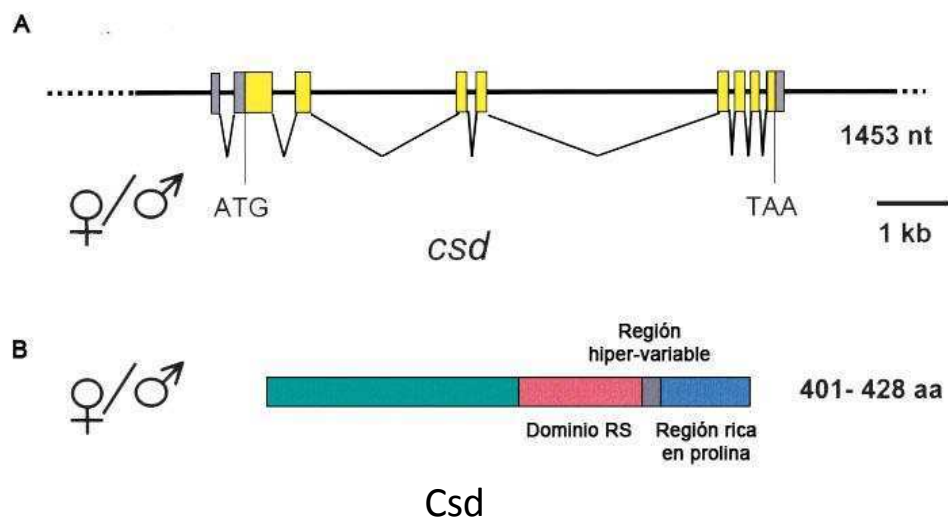


Figura 4. Representación gráfica del gen *csd* y su producto proteico según presentada en Beye (2004). (A) En amarillo se representan los exones, se indica codón de inicio y de finalización y la longitud del transcrito final. (B) Representación de los distintos dominios de la proteína Csd: en rosa el dominio SR rico en arginina-serina, en gris la región hipervariable que tiene distinto número de repeticiones según la variante alélica, y en azul la región rica en prolina. La cantidad de aminoácidos varía entre los valores indicados, según la variante alélica.

Hasselmann y colaboradores (2008) describieron otro componente de la cascada regulatoria del gen *csd*, que también está localizado en el locus determinante del sexo, a 12 Kb de distancia del *csd*. Los autores proponen que el gen *feminizer (fem)* es el gen ancestral a partir del cual se originó el *csd* y codifica para una proteína del tipo SR con un dominio rico en arginina y serina. Además, el gen *fem* presenta una estructura similar al gen *tra* de dípteros, con mayor similitud al de *Ceratitis capitata*. Al igual que el gen *tra*, el gen *fem* genera dos variantes por corte y empalme o “splicing” alternativo. La variante específica de machos tiene un codón de finalización que lleva a un producto no funcional, mientras que la variante específica de hembras codifica para una proteína funcional (Figura 5). Mediante ensayos con

ARN de interferencia, tanto para el gen *fem* como para el *csd*, se demostró que el producto de *fem* es indispensable para el desarrollo de hembras y que estaría controlado por el *csd*.

Cabe destacar que los estudios filogenéticos, basados tanto en la secuencia génica como en el producto proteico de los genes *fem* y *csd*, indican que este último se originó por duplicación a partir del *fem* luego de la separación de las abejas sin aguijón, los abejorros y las abejas (hace 70 millones de años), pero antes de la divergencia de las abejas (hace 10 millones de años) (Figura 6). Por lo tanto, el gen *csd* no sería la base molecular universal para la determinación del sexo por alelos complementarios en una gran variedad de especies de himenópteros, incluyendo hormigas y avispas, sugiriendo que existe otra señal primaria en estas especies (Hasselmann et al. 2008).

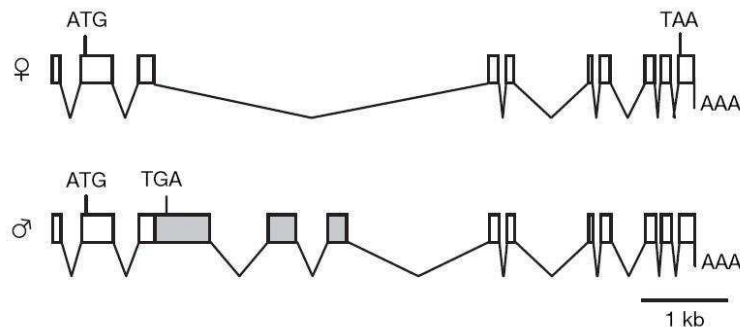


Figura 5. Diagrama de las variantes de corte y empalme de *fem* según Hasselmann y colaboradores (2008). Los exones en común se representan en blanco y los exones específicos de macho en gris. Se indican los codones de inicio y de finalización y el sitio de poliadenilación.

Actualmente este modelo de determinación del sexo por alelos complementarios ha sido descrito en más de 60 especies de Hymenoptera, incluyendo moscas de sierra o moscas portasierra (Symphyta), avispas parasitoides (Apocrita, Parasítica) y hormigas, abejas y avispas (Apocrita, Aculeata).

**ANTECEDENTES CITOGENÉTICOS EN
HYMENOPTERA**

- **Generalidades citogenéticas**

Los himenópteros del grupo Parasítica constituyen uno de los grupos taxonómicos más complejos de insectos (Rasnitsyn 1980, Quicke 1997) y, a pesar de su importancia económica como controladores de plagas de la agricultura y forestales así como de ciertos insectos benéficos, i.e. depredadores y parasitoides primarios (Viktorov 1976, Rasnitsyn 1980, Godfray 1994), muchos de los problemas de su taxonomía han sido insuficientemente investigados (Gokhman 2004). El uso de técnicas de investigación moderna puede ser muy útil en los himenópteros parasitoides, dado que ellas proveen información complementaria para resolver problemas taxonómicos y filogenéticos (Gokhman 2007a, 2007b).

Los estudios cariotípicos tienen ciertas ventajas indiscutibles sobre los métodos experimentales utilizados en los estudios taxonómicos y filogenéticos en los himenópteros. Los datos obtenidos en las últimas décadas demuestran que los estudios cariológicos pueden proporcionar resultados importantes sobre la estructura genética, el ciclo de vida y características ecológicas, taxonomía, evolución y filogenia de los insectos (Gokhman & Kuznetsova 2006, Gokhman 2009).

Los estudios citogenéticos permiten revelar ciertas características estructurales de cada uno de los cromosomas y del cariotipo en su conjunto. A nivel de cada cromosoma estas características son: el tipo morfológico, que se caracteriza por la presencia o ausencia de un centrómero localizado (cromosomas monocéntricos u holocéntricos, respectivamente); la longitud absoluta y relativa de los cromosomas (expresado en porcentaje de la longitud total de todos los cromosomas en el conjunto haploide); la presencia de constricciones secundarias, que en la mayoría de los casos son regiones organizadoras nucleolares (NORs); el índice centromérico; presencia, distribución y composición de heterocromatina. Las características de los cariotipos son: el número de cromosomas, tanto diploide como haploide; el mecanismo de determinación del sexo, incluyendo la presencia o ausencia de cromosomas sexuales; el número de brazos del cromosoma; el grado de simetría del cariotipo (Borges et al. 2004, Gokhman & Kuznetsova 2006, Gokhman 2009).

Estas características cariotípicas se describen por medio de técnicas de tinción convencional, eficientes para la caracterización numérica y estructural, técnicas de bandas cromosómicas (bandas C, tinción argéntica o AgNOR, bandas fluorescentes) y/o hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas específicas de ADN. Las técnicas de bandas cromosómicas son importantes al permitir un conocimiento más detallado de la estructura cromosómica, así como la detección de posibles alteraciones o reordenamientos cromosómicos que pudieran haber ocurrido en el cariotipo de una especie (Pompolo & Takahashi 1990a, Gomes et al. 1998).

Si bien hoy en día se cuenta con información sobre el número cromosómico de más de 400 especies de himenópteros, los estudios más detallados empleando técnicas de bandas cromosómicas y de citogenética molecular se han centrado particularmente en especies sociales (Gokhman & Kuznetsova 2006).

- **Número, morfología y tamaño cromosómico**

En el caso particular de los endoparasitoides, la insuficiente información sobre el genotipo de la mayoría de las especies se debe a que los estados inmaduros de desarrollo ocurren en el interior del pupario del hospedador, dificultando el acceso al material en el momento adecuado para su análisis.

El número cromosómico haploide (n) de las diferentes especies de Hymenoptera del grupo Parasítica puede variar de 3 a 23. El número cromosómico haploide más bajo, $n = 3$, se describió para *Aphidius* sp. (Nees) (Hymenoptera, Braconidae), *Encarsia protransvena* (Viggiani) (Hymenoptera, Aphelinidae), *Brachymeria intermedia* (Nees) (Hymenoptera, Chalcididae) y *Perilampus ruschkai* (Hellén) (Hymenoptera, Perilampidae) (Hung 1986, Quicke 1997, Baldanza et al. 1999, Gokhman 2000, 2005), mientras que el número más alto, $n = 23$, se observó en *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera, Braconidae) (Kitthawee et al. 2004). La distribución de las especies según el número cromosómico haploide es bimodal, con dos números cromosómicos modales, $n = 6$ y 11 (Gokhman 2003, 2004, 2006).

Las estimaciones de los niveles de diversidad de los caracteres cromosómicos en los Hymenoptera Parasítica han cambiado sustancialmente durante las últimas décadas. Hasta mediados de los años 70, la mayoría de los especialistas proponían que los números cromosómicos de este grupo de insectos eran muy uniformes (Crozier 1975). Sin embargo, publicaciones simultáneas demostraron que los miembros de diversas familias podían diferir en el número de cromosomas (Goodpasture 1974, 1975, Goodpasture & Grissell 1975). Actualmente, está ampliamente aceptado que el número cromosómico de estos insectos es relativamente estable a nivel de género, aunque algunas veces se observan diferencias en este número incluso entre poblaciones morfológicamente indistinguibles de himenópteros parasíticos (Gokhman & Quicke 1995, Gokhman 1997a, 2000, 2002a).

Los cromosomas de los himenópteros del grupo Parasítica, así como los del orden en general, son monocéntricos, es decir, presentan una constricción primaria conspicua donde se concentra la actividad cinética durante la migración en anafase (Crozier 1975). El tamaño cromosómico varía entre 12-15 y 0,5-1 μm ; sin embargo, la mayoría de los cromosomas son de tamaño mediano (3-5 μm) (Gokhman 2003, 2004). En promedio, el tamaño y número cromosómico presentan una correlación negativa no sólo en este grupo, sino también en otros miembros del orden (Gokhman 2009). En general, los cromosomas de la mayoría de los miembros de este grupo decrecen gradualmente de tamaño y el cromosoma de menor tamaño del complemento usualmente difiere en longitud de 2 a 2,5 veces. Sin embargo, es común encontrar importantes diferencias de tamaño entre los cromosomas individuales en algunos representantes de las familias Ichneumonidae, Braconidae, Drynidae y algunos calcidoideos de las familias Eulophidae y Trymidae (Gokhman 2001a, 2002b, 2009).

Los cromosomas bibrachiados, i.e. con dos brazos bien diferenciados, prevalecen en la mayoría de estos himenópteros. Los cromosomas acrocéntricos son relativamente comunes en Cynipidae (Sanderson 1988) y sólo están presentes en algunos representantes de otros grupos como Ichneumonidae (Abe 1994, Gokhman 2001a, 2003, 2004). Por lo tanto, las especies de Hymenoptera del grupo Parasítica se caracterizan por tener cariotipos simétricos (Stebbins 1950).

Hasta el presente, se analizaron citogenéticamente 170 especies de la superfamilia Ichneumonoidea, que incluyen 110 especies de la familia Ichneumonidae y 60 de Braconidae (Gokhman 2009) (Figura 7). En esta superfamilia, los números cromosómicos haploides varían

de 3 a 21, con una moda en 11. El mismo número modal ($n = 11$) es característico para Ichneumonidae, con un rango entre $n = 6 - 21$. Sin embargo, para la mayoría de los miembros de la familia Braconidae, la variación de los valores de n es mucho menor, de 3 a 20, pero con dos modas en 7 y 10 (Gokhman 2004).

El análisis de la variación de los números cromosómicos en las avispas parasíticas de la familia Braconidae muestra que prevalecen valores diferentes en las tres principales ramas filogenéticas del grupo. Los números cromosómicos entre 14 y 20 son característicos de los Braconidae ciclóstomos (subfamilias Doryctinae, Opiinae y Alysiinae), entre 3 y 9 son predominantes en Alysiinae (grupo hermano de los Braconidae ciclóstomos) y entre 5 y 11 para los Braconidae no-ciclóstomos (subfamilias Meteorinae, Microgastrinae, Cheloninae, etc.) (Figura 7) (Gokhman 2004).

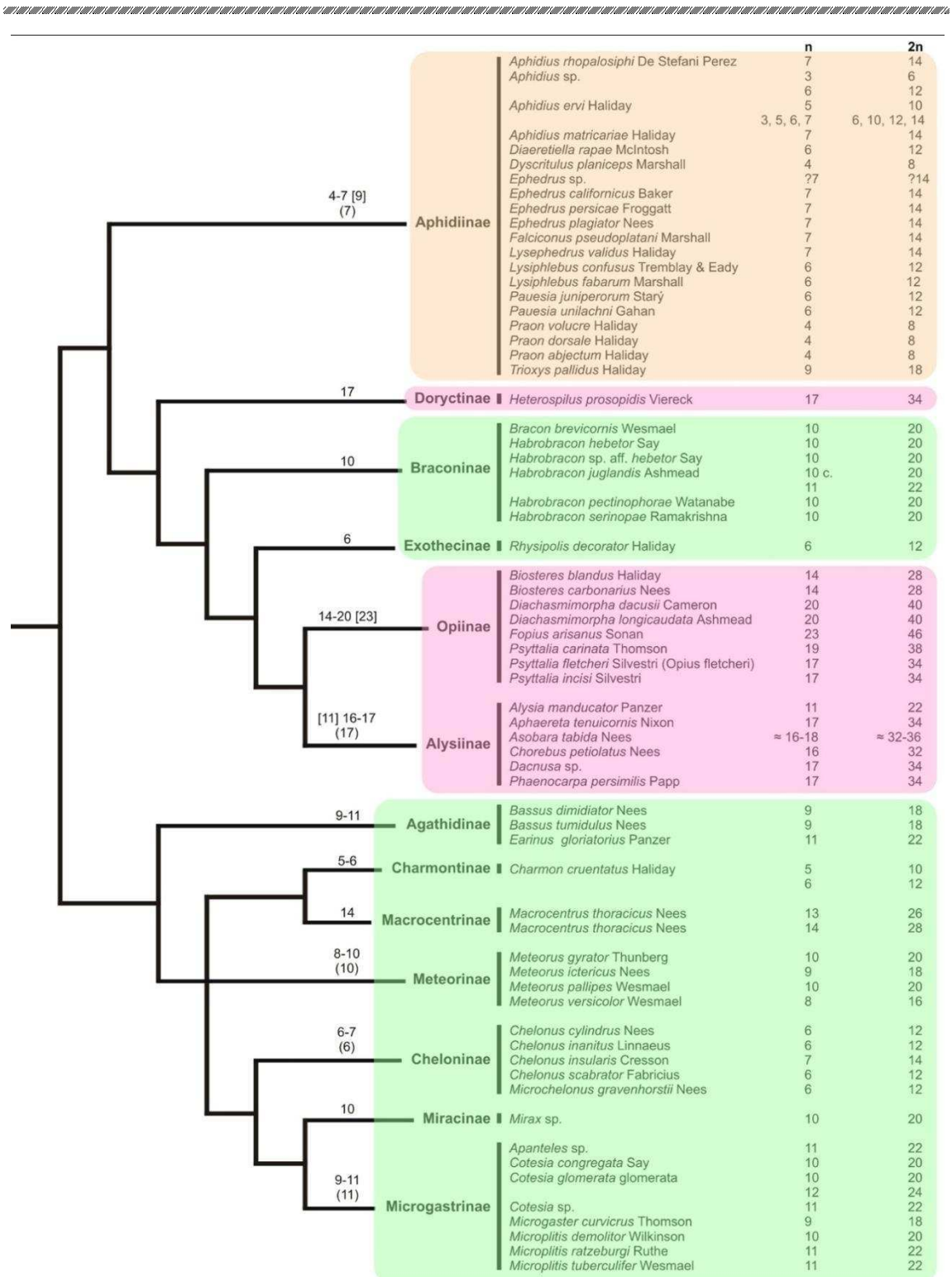


Figura 7. Árbol filogenético de Braconidae (adaptación de Gokhman 2009; simplificado de Dowton et al. 2002). Se incluyen los valores límite de los números cromosómicos, el número modal y los valores aberrantes se indican entre paréntesis y entre corchetes, respectivamente. Naranja: Aphidiinae, rosa: Braconidae ciclóstomos, verde: Braconidae no-ciclóstomos.

Cantidad y composición de la heterocromatina constitutiva

El ADN del núcleo eucariota está empaquetado con proteínas estructurales históricas y no históricas, ordenado en distintos niveles de compactación (Woodcock & Dimitrov 2001, Luger & Hansen 2005). El nivel de empaquetamiento varía a lo largo del ciclo celular y de la diferenciación celular. La cromatina alcanza su mayor grado de compactación cuando se dispone formando los cromosomas metafásicos y su menor grado de compactación en el núcleo interfásico. Sin embargo, la cromatina interfásica no se encuentra completamente descondensada y comprende dos tipos morfológicamente diferenciables: la eucromatina dispersa y la heterocromatina condensada (Hennig 1999, Richards & Elgin 2002). Los estudios sobre la heterocromatina permitieron entender el papel de la modificación de las histonas, del ARN de interferencia y de otros mecanismos epigenéticos en el control de la actividad génica (Jenuwein & Allis 2001, Lund & van Lohuizen 2004, Bernstein & Allis 2005, Grigoryev et al. 2006).

Se pueden diferenciar dos tipos de heterocromatina, aquella asociada con la represión diferencial de porciones del genoma, como por ejemplo el silenciamiento de uno de los cromosomas X en las hembras de mamíferos (Plath et al. 2002), llamada heterocromatina facultativa, y aquella ubicada usualmente en las regiones teloméricas y pericentroméricas, asociada a regiones pobres en genes y ricas en secuencias repetitivas y transposones (revisión en Kidwell 2002, Richards & Elgin 2002, Palomeque et al. 2006), llamada heterocromatina constitutiva. Sin embargo, a pesar de la idea generalizada sobre la heterocromatina constitutiva como material inerte, hay cada vez más evidencias sobre su importante papel durante el apareamiento cromosómico y la correcta segregación de los cromosomas homólogos, el efecto de posición variegada y su composición en genes y otras secuencias funcionales de ADN (Sumner 2003, Papeschi & Bressa 2006).

La distribución, composición y cantidad de heterocromatina constitutiva provee información esencial sobre la evolución de los cromosomas en eucariotas (Hoshiba & Imai 1993). En Hymenoptera, estudios previos revelaron varios patrones de bandas (Baldanza et al. 1991, Hoshiba & Imai 1993, Odierna et al. 1993). En particular, los cromosomas de avispas parasíticas tienen usualmente segmentos de heterocromatina en posición pericentromérica y telomérica (Reed 1993, Hoshiba & Imai 1993, Gokhman 1997b, Baldanza et al. 1999, Gokhman & Westendorff 2000), siendo rara la presencia de segmentos intercalares.

En Hymenoptera se utiliza el sistema TAM (Imai 1991) para la clasificación de los cromosomas en función de la distribución de la heterocromatina en ellos. Existen tres categorías básicas: telocéntricos (T), acrocéntricos (A) y metacéntricos (M). El cromosoma tipo T es un cromosoma ideal que surge por fisión céntrica de un cromosoma M y se utiliza sólo para estudios teóricos, ya que no existe en la práctica. Los cromosomas tipo A y M se definen según si los brazos son eucromáticos o heterocromáticos y por la relación en la longitud de los brazos p y q:

- A: brazo corto heterocromático y brazo largo eucromático, longitud brazo p < longitud brazo q.
- M: ambos brazos eucromáticos, longitud brazo p = longitud brazo q.

A su vez, existen casos especiales como:

- A^e: ambos brazos eucromáticos, longitud brazo p < longitud brazo q.

- A^M : brazo p o q heterocromático, longitud brazo p = longitud brazo q. Este tipo de cromosoma ha recibido el nombre de “pseudoacrocéntrico”. Este término se propuso en Hymenoptera para referirse a aquellos cromosomas con un brazo corto completamente heterocromático y un brazo largo eucromático. Los cromosomas pseudoacrocéntricos son relativamente frecuentes, encontrándose en más de 56 / de las especies analizadas hasta el momento (Tabla 3).

- A^h : ambos brazos heterocromáticos, longitud brazo p < longitud brazo q.

La técnica de bandas C revela la cantidad, distribución y localización de la heterocromatina constitutiva tanto en los cromosomas metafásicos como en los núcleos interfásicos. Al aplicar esta técnica, ocurre la desnaturalización de las regiones cromosómicas menos condensadas, debido a la acción de una solución alcalina (Macgregor & Varley 1988). Sin embargo, el grado de condensación y la habilidad de formar segmentos C positivos no están estrictamente correlacionados (Gokhman 2009); de hecho, la definición citogenética de heterocromatina debió ser expandida para incluir aquellas regiones que, aunque no visiblemente condensadas, manifiestan silenciamiento de genes reporteros (Richards & Elgin 2002, Huisinga et al. 2006).

Una ventaja para el estudio de los segmentos heterocromatínicos en Hymenoptera, es que el análisis estándar de las preparaciones cromosómicas muestra la presencia de regiones más fuertemente teñidas (Pompolo & Takahashi 1990a). Imai y colaboradores (1977, 1988) observaron que la técnica para la preparación de cromosomas de hormiga, basada en dispersión y tinción con Giemsa, demuestra regiones heteropicnóticas positivas, que llamaron bandas C, sin necesidad de pretratamiento.

Bajo el sistema TAM, las bandas de heterocromatina constitutiva o bandas C positivas localizadas en la región pericentromérica, intersticial o terminal se representan como A^c , A^i , A^t , M^c , M^i y M^t . Todas las combinaciones posibles, su representación gráfica y nomenclatura se presentan en la Figura 8.

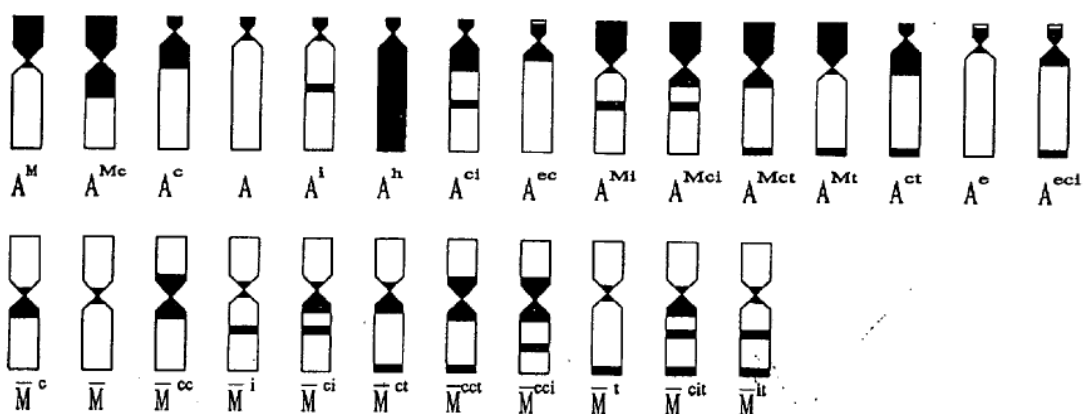


Figura 8. Extraída de Hoshiba & Imai 1993. Representación esquemática de los cromosomas con bandas C de abejas y avispa, con su correspondiente nomenclatura.

La mayoría de los segmentos de heterocromatina constitutiva en los cromosomas eucariotas contienen altas concentraciones de ADN altamente repetido (ADN satélite). Este

ADN satélite puede variar en composición desde secuencias altamente ricas en pares de base AT hasta secuencias altamente ricas en nucleótidos GC, y en longitud desde unidades de repetición constituidas por dos pares de bases hasta cientos o miles de pares de bases (Sumner 1990). Sin embargo, no todos los segmentos de heterocromatina contienen ADN altamente repetido. En los últimos años se han incrementado las evidencias sobre la acumulación de elementos transponibles en la heterocromatina (Sumner 1990). Además, dentro de una misma especie o en un mismo cromosoma puede haber diferentes tipos de ADN en la heterocromatina constitutiva; por lo tanto, las propiedades de la heterocromatina no dependerían únicamente de la presencia de secuencias de ADN específicas.

La técnica de bandas secuenciales fluorescentes provee información sobre la composición de bases de la heterocromatina constitutiva revelada por bandas C, utilizando los fluorocromos DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) y CMA₃ (cromomicina A₃). El fluorocromo DAPI permite revelar si las regiones heterocromáticas C positivas estarían constituidas por secuencias ricas en los nucleótidos AT, mientras que el CMA₃ revela si las regiones heterocromáticas son ricas en los nucleótidos GC. Una composición de bases diferencial implica orígenes independientes de la heterocromatina; por lo tanto, su caracterización molecular resulta esencial para estudios taxonómicos y filogenéticos comparativos (Domínguez et al. 2005).

- **Cantidad y distribución de regiones organizadoras nucleolares (NORs)**

En todos los eucariotas existen tres genes de ADN ribosomal (ADNr), 18S, 5,8S y 28S, unidos en una única unidad transcripcional y un cuarto gen (5S) que se dispone en repeticiones pero se transcribe separadamente (Drouin & de Sa 1995). Las tres subunidades 18S, 5,8S y 28S están separadas entre sí por secuencias espaciadoras transcribibles internas (“internal transcribed spacers”, ITS) y, a su vez, están organizadas formando repeticiones en tándem separadas entre sí por un espaciador no transcribible (“nontranscribed spacer”, NTS) (Figura 9) (Tautz et al. 1988, Hankeln & Schmidt 1993, Roehrdanz et al. 2010). En el genoma puede haber 100 o más copias de estos genes; su distribución en los cromosomas y la cantidad de repeticiones en cada locus varían según la especie, la población y los individuos (Lorite et al. 1997). La actividad de los genes ribosomales genera una estructura subnuclear distintiva, el nucléolo, que es el sitio donde ocurre la biogénesis de los ribosomas (Scheer & Hock 1999). Es por esta razón que las agrupaciones o “clusters” de genes ribosomales constituyen las denominadas regiones organizadoras nucleolares (NORs).

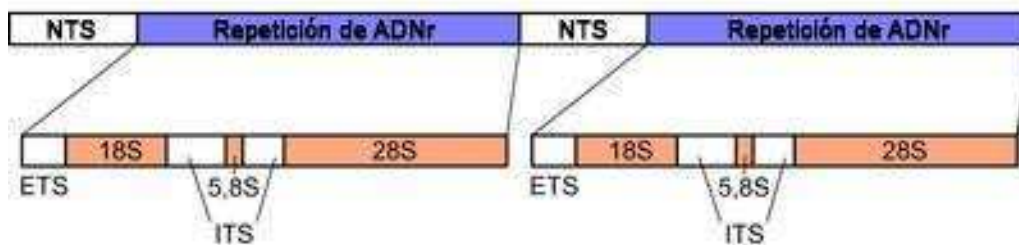


Figura 9. Disposición del ADNr eucariótico 18S, 5,8S y 28S en tándem; el ADNr 5S se codifica separadamente. **NTS:** espaciador no transcribible, **ETS:** espaciador transcribible externo, **ITS:** espaciador transcribible interno.

La región NOR se suele observar en los cromosomas metafásicos como una constricción secundaria y cumple un papel crucial en la organización del material nucleolar al finalizar la mitosis y/o meiosis. El número de regiones NORs puede variar de especie a especie; sin embargo, dentro de un cariotipo dado, el número y localización de NORs son más o menos constantes. Por regla general, al menos una región NOR está presente por juego de cromosomas y su eliminación resulta en un comportamiento nuclear anormal (Sumner 2003).

Las regiones NOR pueden ser detectadas por la técnica convencional de tinción argéntica (AgNOR), que revela la funcionalidad de los genes ribosomales, y por la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas específicas de ADNr, que permite detectar la localización precisa de los genes ribosomales. La tinción AgNOR es un método altamente selectivo para la tinción del nucléolo en células interfásicas y de las regiones NORs en células con cromosomas mitóticos y meióticos, que fueron transcripcionalmente activos durante la interfase anterior (Goodpasture & Bloom 1975, Howell & Black 1980, Papeschi 1995). El tamaño de la señal revelada con la tinción argéntica en los cromosomas es proporcional al nivel transcripcional previo de la región NOR (ver Hubbell 1985). Por otro lado, el FISH con sondas de ADNr, autólogas (ADN molde de la misma especie) o heterólogas (ADN molde de otras especies), detecta directamente la localización de los cistrones ribosomales independientemente de su estado de actividad (Sumner 1990). El tamaño de la señal de hibridación de una región NOR es proporcional al número de cistrones ribosomales que contiene (Wachtler et al. 1986, Suzuki et al. 1992, Leitch & Heslop-Harrison 1992).

La determinación del número y localización de los loci de ADNr/AgNOR hace de ellos un importante marcador cromosómico, que puede ser muy útil para la identificación taxonómica de especies, el análisis de la evolución del cariotipo y para un mejor conocimiento de la estructura y organización cromosómica.

En algunos insectos de los órdenes Orthoptera (Camacho et al. 1991), Coleoptera (Maffei et al. 2001) e Hymenoptera, incluyendo Formicidae, Sphecidae y Meliponini (Costa et al. 2004), las bandas CMA₃ positivas colocalizan con las regiones NOR, indicando que los “clusters” de ADNr son ricos en pares de bases GC y proveyendo una herramienta indirecta de detección (Schmid & Guttenbach 1988, Cerbah et al. 1995, Reed & Phillips 1995, Vitturi et al. 1999).

En Hymenoptera es común detectar con bandas CMA₃ y/o FISH múltiples regiones NOR en el complemento cromosómico haploide (Hirai et al. 1994), pero sólo una cantidad limitada de estos NORs se detectaron mediante tinción argéntica, i.e. son activos y forman un nucléolo activo (Matsumoto et al. 2002). En Hymenoptera es muy frecuente la existencia de sólo un par de NORs activos (Gokhman 2009).

- **Comportamiento meiótico: oogénesis y espermatogénesis**

El comportamiento de los cromosomas de himenópteros en los distintos procesos de división celular es diferente en ambos sexos, especialmente durante la producción de gametas (Crozier 1975). Debido al sistema genético de haplodiploidía (arrenotoquia) característico del orden, las hembras producen gametas mediante una división meiótica normal, mientras que los machos llevan a cabo una meiosis modificada, similar a una mitosis (Patterson & Porter 1917, Dreyfus & Breuer 1944, Crozier 1975, Palomeque et al. 1990).

Oogénesis: los ovarios en Hymenoptera son del tipo politróficos, con el desarrollo de células nodrizas adyacentes a cada oocito. En el germario cada oogonia da origen a un grupo de células, una de las cuales se desarrolla en oocito y el resto en células nodrizas para su nutrición. En Parasítica, la meiosis femenina ocurre de una manera similar a la descrita para otras especies de Hymenoptera (Tagami & Miura 2007). En particular, los cromosomas meióticos usualmente se disponen en “bouquet” en cigotene (Stille & Dävring 1980, Sanderson 1988). Hasta el presente, muy pocos son los antecedentes con respecto a la diversidad morfológica de los cromosomas meióticos y al número y distribución de quiasmas en la meiosis femenina (Gokhman 2009). Los antecedentes describen la existencia de un solo quiasma por bivalente en las avispas parasíticas que poseen números cromosómicos altos (Sanderson 1988, Gokhman et al. 1999). En contraste, en muchas avispas parasíticas con menor número de cromosomas la mitad de los bivalentes de los cariotipos meióticos presentan por lo menos dos quiasmas (Gokhman 2001b, 2002b, 2002c, 2003). La mayoría de los quiasmas son terminales, pero en algunos casos se han observado quiasmas subterminales e incluso intersticiales (Gokhman et al. 1999, 2002b, 2003). Un fenómeno frecuente es la disminución en la tinción de los cromosomas durante la fase de crecimiento del oocito; el grado de disminución depende de la especie y termina con la aparición de los cromosomas en la metafase I meiótica. La maduración del oocito se detiene en metafase I hasta que el huevo es ovipuesto (Crozier 1975).

Espermatogénesis: debido al carácter haploide de los machos, la espermatogénesis no puede desarrollarse a través de una meiosis normal, ya que no puede existir apareamiento de homólogos ni segregación de genes. Hasta el momento, se describieron los siguientes sistemas de gametogénesis en machos:

1) La primera división meiótica es abortiva, i.e. la primera división meiótica ocurre sin reducción cromosómica. Todos los cromosomas migran hacia uno de los polos, resultando en la expulsión de una yema de citoplasma anucleada. La segunda división implica la separación de las cromátidas hermanas y una división desigual del citoplasma, la célula más pequeña degenera y el único espermatocito generado da origen a un solo espermatozoide. Este sistema de espermatogénesis fue descrito en abejas (Crozier 1975 y referencias incluidas).

2) La primera división meiótica es abortiva, con la expulsión de un brote de citoplasma anucleado. Sin embargo, en la segunda división la segregación de las cromátidas y del citoplasma es equitativa, dando origen a dos espermatozoides por cada espermatocito. Este sistema se describió en una gran variedad de especies de Hymenoptera (Crozier 1975 y referencias incluidas).

3) La primera división meiótica transcurre con la segregación de las cromátidas hermanas a cada polo, dando origen a dos espermatocitos iguales. La segunda división meiótica es abortiva y no resulta en la división del núcleo. En el citoplasma aparece una constricción en el lado opuesto al del núcleo, generándose un glóbulo de citoplasma anucleado que permanece unido al espermatocito a lo largo de la maduración del espermatozoide. Como resultado final, por cada espermatocito se generan dos espermatozoides. Este proceso se describió en *Telenomus fariai* (Lima) (Hymenoptera, Scelionidae) (Dreyfus & Breuer 1944).

- **Reordenamientos cromosómicos**

Las mutaciones cromosómicas involucradas en el origen de la diversidad cariotípica observada en el orden Hymenoptera pueden clasificarse en dos grupos principales: aquellas debidas a cambios en la estructura de los cromosomas y las que provocan variaciones en el número cromosómico (Swanson et al. 1981, Ayala & Kiger 1984).

1) Cambios en la estructura cromosómica: las deleciones son raras en Hymenoptera (Imai et al. 1977, 1988), ya que la pérdida irreversible de una pequeña parte del genoma tiende a disminuir significativamente la viabilidad del portador, especialmente luego de la transición al estado homocigota (hembras) o hemicigota (machos). El único ejemplo de deleción encontrado en este orden afecta segmentos heterocromáticos, que se supone contienen pocos genes activos (Imai et al. 1977, 1988).

Por otro lado, las duplicaciones sí son frecuentes en este grupo (Hoshiba & Imai 1993). Un claro ejemplo de este tipo de reordenamientos es el aumento en tándem de la heterocromatina constitutiva, que conlleva a la aparición de los cromosomas pseudoacrocéntricos (Gokhman 2009).

Otro tipo de fenómenos, como inversiones y translocaciones, son difíciles de detectar, especialmente en estado homocigota (Gokhman 2009).

2) Cambios en el número cromosómico: las fusiones y fisiones cromosómicas son los mecanismos más importantes que afectan el número cromosómico (White 1973), siendo considerados de suprema importancia durante el proceso de evolución del cariotipo dentro de este orden (Hoshiba & Imai 1993).

En el grupo Parasítica, al predominar los cromosomas bibraqueados, la posibilidad de que ocurran fusiones céntricas es bastante limitada (Gokhman 2009). Sin embargo, este tipo de reordenamientos son comunes en los grupos donde prevalecen los cromosomas acrocéntricos, como por ejemplo en la familia Aphelinidae (Baldanza et al. 1999). Las fusiones en tándem ocurren con mayor frecuencia que las fusiones céntricas, encontrándose muchos ejemplos en la subfamilia Ichneumoninae (Ichneumonidae) (Gokhman 1990).

El estudio de especies cercanas filogenéticamente permite evidenciar la ocurrencia de fisiones (Gokhman 2009). Los ejemplos más claros de este tipo de reordenamiento se observan en la subfamilia Cheloninae (Braconidae) y en la mayoría de los miembros de la familia Chalcididae. La evidencia más común de este tipo de alteraciones es la presencia de cromosomas pseudoacrocéntricos, originados luego de la fisión por adición de heterocromatina (Gokhman 2001a).

Las aneuploidías también son frecuentes en las avispas parasíticas, siendo principalmente hiperploides, i.e. los individuos contienen material cromosómico adicional. Sin embargo, no se han descrito individuos hipoploides, i.e. hembras con parte de su genoma en estado haploide (Gokhman 2009).

Estos reordenamientos cromosómicos en su conjunto llevan a alterar diversas características del cariotipo como: i) el número de cromosomas, ii) el tamaño de los cromosomas, iii) la proporción entre cromosomas con dos brazos y cromosomas acrocéntricos, iv) el tamaño y la localización de los segmentos de heterocromatina constitutiva, v) la localización y la cantidad de regiones organizadoras nucleolares y vi) la cantidad y localización de quiasmas (Gokhman 2009).

- **Evolución del cariotipo**

Al realizar estudios evolutivos a nivel de cariotipo, los números cromosómicos modales son considerados como ancestrales o iniciales (Emelyanov & Kirillova 1989, Gokhman & Quicke 1995, Shaposhnikov et al. 1998). Si bien existen diversas opiniones sobre esta afirmación (Frolich 1987, Quicke 1993), esta asociación es muy probable, especialmente si se consideran grupos externos para realizar comparaciones (Gokhman 2009).

Existen dos teorías principales sobre la tendencia de evolución del cariotipo en Hymenoptera. Una teoría general para el orden, propuesta por Imai y colaboradores (1986, 1988, 1994), y otra descrita por Gokhman (2004), específica para el grupo Parasítica:

Teoría general para Hymenoptera: Imai y colaboradores (1986, 1988, 1994) propusieron la Teoría de Interacción Mínima (TIM) para explicar la evolución del cariotipo en Hymenoptera. Esta teoría plantea que el cariotipo primitivo tenía un número pequeño de cromosomas de gran tamaño y, con el tiempo, estos cromosomas se hicieron más pequeños e incrementaron su número a través de fisiones céntricas, a fin de prevenir interacciones deletéreas en el núcleo interfásico, tales como translocaciones (Rocha et al. 2003). Esta teoría supone que el incremento en el número cromosómico ocurre a través de fisiones, que trae aparejado un incremento en la cantidad de heterocromatina constitutiva debido a la inestabilidad de los cromosomas luego de la fisión, y la eliminación de las nuevas bandas C a través de fusiones céntricas o inversiones pericentroméricas. La observación de cromosomas pseudoacrocéntricos juega un papel muy importante en el desarrollo de esta teoría (Hoshiba & Imai 1993). La TIM puede ponerse a prueba usando técnicas de citogenética molecular, al analizar algún tipo de ADN localizado en la heterocromatina constitutiva, ya que el mismo se dispersará y multiplicará a medida que las bandas C se incrementen durante la evolución del cariotipo (Hirai et al. 1994). Las regiones de ADNr constituyen uno de los mejores candidatos para este tipo de experimentos, ya que en los cromosomas eucariotas se encuentran frecuentemente en regiones de heterocromatina constitutiva (Babu & Verma 1987, Hadjiolov 1985, King et al. 1990, Hagemann et al. 1993, Hirai et al. 1994).

Teoría específica para Parasítica: Gokhman (2002d, 2003) describió dos tendencias principales:

1) Una disminución en el número cromosómico: este fenómeno pudo haber ocurrido repetida e independientemente en los diferentes grupos de Hymenoptera parasíticos, principalmente a través de fusiones en tándem y en menor frecuencia mediante fusiones céntricas. Esta tendencia se observa principalmente a nivel de superfamilia y familia. Un incremento en el número cromosómico es característico sólo en algunos géneros y especies y ocurre a través de la formación de aneuploides o, en la minoría de los casos, mediante fisiones céntricas (Gokhman 2004).

2) Un incremento en la asimetría del cariotipo: esta tendencia se limita sólo a algunas familias, subfamilias y tribus de Parasítica. Estos cambios ocurren a través de un incremento en la diferenciación de los cromosomas en cuanto a su tamaño y/o la proporción de cromosomas acrocéntricos en el cariotipo.

- **Antecedentes sobre la citogenética de *Diachasmimorpha longicaudata***

El cariotipo de *D. longicaudata* fue descrito por Kitthawee et al. (1999) usando preparaciones cromosómicas realizadas a partir de ganglio cerebral y gónadas pretratadas con

colchicina y teñidas con Giemsa. El cariotipo consiste en $2n = 40$ cromosomas en hembras y $n = 20$ cromosomas en machos (15 metacéntricos – submetacéntricos y 5 telocéntricos). Dicho número cromosómico fue corroborado en los individuos provenientes de la cría del Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica, Instituto de Genética “Ewald A. Favret”, INTA, Castelar (Figura 10) (Carabajal Paladino et al. 2004, Carabajal Paladino 2005).

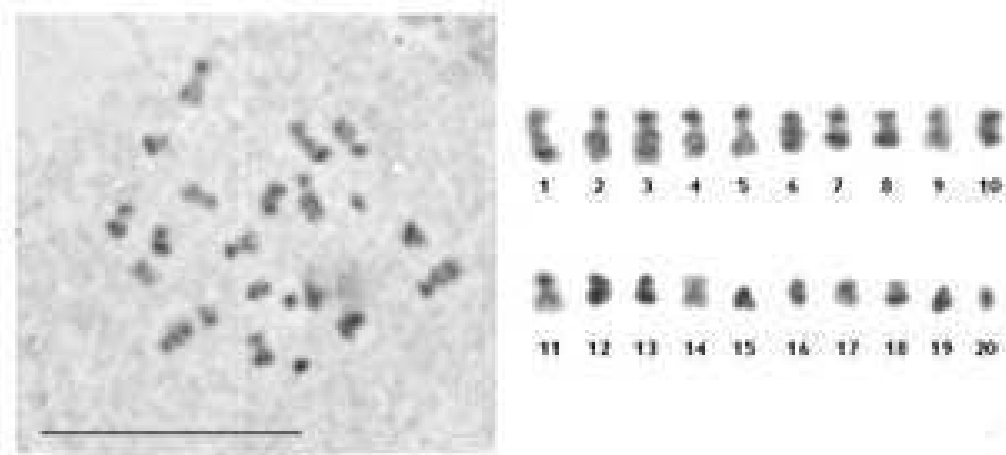


Figura 10. Cariotipo haploide de *Diachasmimorpha longicaudata* obtenido por aplastado y tinción con hematoxilina a partir de testículos de individuos en estado de prepupa. Cromosomas clasificados según Levan et al. (1965). Barra = 10 μm (Carabajal Paladino et al. 2004, Carabajal Paladino 2005).

OBJETIVOS

En este marco teórico, la presente Tesis Doctoral propone analizar dos aspectos del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Braconidae): su sistema de determinación del sexo y su complemento cromosómico.

Para ello se plantea como **objetivo general** caracterizar a *Diachasmimorpha longicaudata* desde el punto de vista citogenético con vistas a clarificar su sistema de determinación sexual.

Como **objetivos particulares** se proponen:

1. Establecer el sistema de determinación del sexo en *D. longicaudata*, con el fin de dilucidar si presenta el sistema de determinación del sexo por alelos complementarios, mediante:

1.1. el estudio de la proporción de sexos secundaria en líneas de alta endogamia, generadas a partir del cruzamiento de una hembra virgen y su hijo (**ENSAYO 1**);

1.2. la verificación de la existencia de machos diploides mediante recuento cromosómico en hijos descendientes de cruzamientos madre por hijo (**ENSAYO 2**).

2. Realizar estudios citogenéticos en *D. longicaudata* con el fin de determinar y caracterizar el complemento cromosómico, el desarrollo meiótico y el sistema de determinación del sexo, mediante:

2.1. la descripción del cariotipo por las técnicas de tinción convencional, bandas C, impregnación argéntica (AgNOR), bandas secuenciales fluorescentes (DAPI/CMA₃) y de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con una sonda específica de ADN ribosomal (ADNr) (**ENSAYO 3**);

2.2. el análisis del comportamiento cromosómico durante la meiosis en machos y hembras, utilizando la heterocromatina constitutiva como marcador citogenético (**ENSAYO 4**);

2.3. el estudio de la espermatogénesis en la especie (**ENSAYO 5**);

2.4. a partir de los estudios citogenéticos realizados en *D. longicaudata*, relacionar la información obtenida con las teorías sobre evolución del cariotipo establecidas para Hymenoptera.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Material Experimental**

Los individuos de *Diachasmimorpha longicaudata* empleados para la realización de esta Tesis provinieron de una cría experimental mantenida en el Laboratorio de Genética de Insectos de Importancia Económica del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” del INTA de Castelar (provincia de Buenos Aires, Argentina). La cepa utilizada para fundar esta colonia experimental fue importada desde México a Tucumán en 1998 e introducida al INTA de Castelar en 2001 (SENASA, Expte. n° 14054/98). Esta especie se crió empleando larvas de *Ceratitis capitata* y se mantuvo en cámara de cría a 25 °C, 85 % de humedad relativa y un fotoperiodo 18:6 (horas luz: horas oscuridad).

A las hembras adultas de *D. longicaudata* se ofrecieron larvas de *C. capitata* en medio artificial (Terán 1977), en cajas de Petri plásticas (de 5 cm de diámetro y 1 cm de profundidad) cubiertas con tela de algodón (“voile”), por un período de seis horas. Luego de este tiempo, se transfirieron las larvas de *C. capitata* a una bandeja plástica con medio artificial fresco para que completaran su desarrollo. Estas bandejas, a su vez, se colocaron dentro de otras que contenían una capa de vermiculita como sustrato de pupación. Tanto las larvas como las pupas de *C. capitata* (parasitizadas y no parasitizadas) se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales descriptas previamente para los parasitoides adultos. Los parasitoides en estadio inmaduro de desarrollo se recuperaron de los puparios parasitizados mediante disección bajo microscopio estereoscópico binocular Olympus SZ11.

- **ENSAYO 1: Estudio de la proporción de sexos secundaria y de la tasa de mortalidad en líneas de alta endogamia, generadas a partir del cruzamiento de una hembra virgen y su hijo**

ENSAYO 1.1 Obtención de individuos vírgenes

Se tomaron pupas provenientes de una exposición de larvas de *C. capitata* a hembras adultas del parasitoide. Una vez ocurrida la emergencia de las moscas de los hospedadores que no fueron parasitizados, se separaron individualmente las pupas no emergidas en frascos pequeños con vermiculita y se cubrieron con un trozo de “voile”. A medida que fueron emergiendo, los parasitoides machos y hembras fueron acondicionados independientemente en frascos de vidrio provistos con agua y miel. De esta manera, los especímenes del parasitoide se separaron por sexo, evitando cópulas y asegurando la virginidad de los individuos.

ENSAYO 1.2 Establecimiento de las líneas

En base a la metodología descripta previamente (ENSAYO 1.1), se obtuvieron 15 hembras vírgenes, se dispusieron individualmente en frascos de vidrio provistos de agua y una traza de miel. Cuando alcanzaron los siete días de edad, se les ofrecieron larvas de *C. capitata* conforme al procedimiento detallado precedentemente, en unidades de oviposición de metal de 1,5 cm de diámetro y 0,5 cm de profundidad. Luego de cuatro horas, las larvas de la mosca se acondicionaron en base al protocolo de cría, pero individualizadas según la hembra a la cual fueron expuestas. Una vez emergidos todos los hijos, se seleccionó uno aleatoriamente y se lo colocó con su madre. Dos días después, se realizó otra exposición de larvas de *C. capitata* y se

obtuvieron sus descendientes vírgenes. Luego de la emergencia de todos los hijos, se seleccionaron dos hermanos y dos hermanas al azar formando así las dos parejas parentales (F0), dos por cada hembra virgen original. De esta manera, se formaron 15 líneas endogámicas con dos réplicas cada una (30 familias en total). El mismo protocolo de exposición, obtención de individuos vírgenes y formación de parejas se realizó durante cuatro generaciones (F1 a F4), con la excepción de que se armó una sola pareja de hermanos por familia, manteniendo el número de líneas (15) y réplicas (dos) constante (Figura 11).

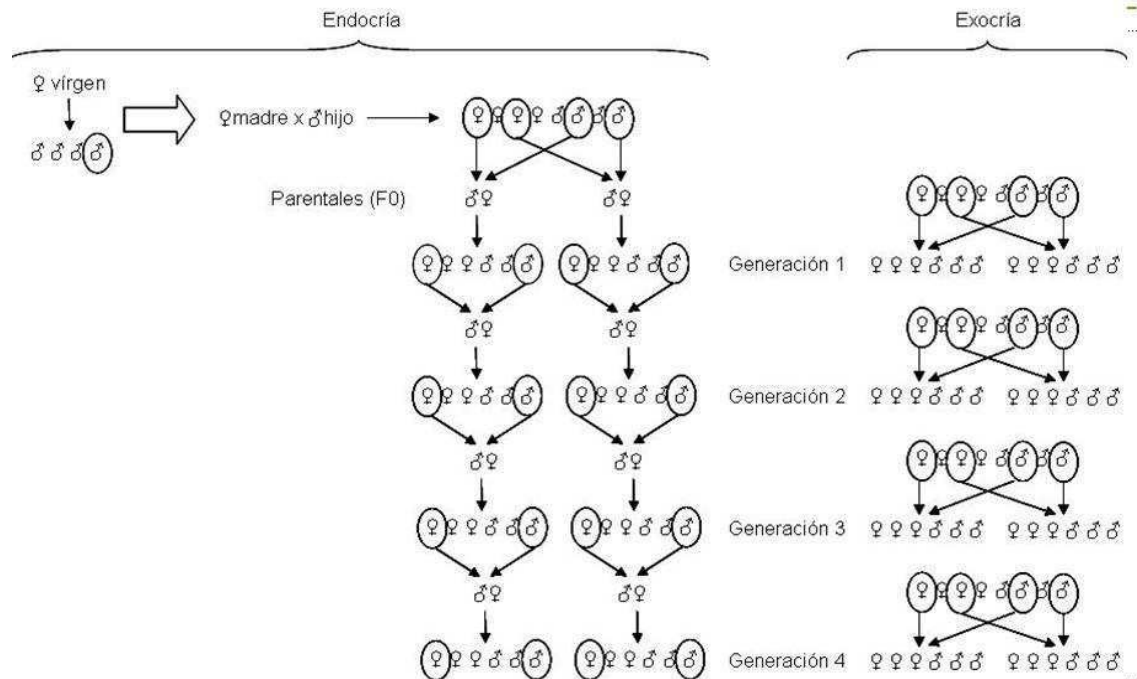


Figura 11. Representación esquemática de los cruces realizados para la generación de las líneas de alta endogamia y sus respectivos controles exogámicos.

ENSAYO 1.3 Controles exogámicos

Como control exogámico se formaron 10 parejas por generación, con un macho y una hembra virgen cada una, no emparentados, provenientes de la cría experimental y seleccionados aleatoriamente (Figura 11).

ENSAYO 1.4 Análisis estadístico

Por cada generación se registró el número de machos y hembras parasitoides emergidos, calculando la “proporción de machos” como:

$$p = \frac{\text{N}^\circ \text{ de machos}}{\text{N}^\circ \text{ de machos} + \text{N}^\circ \text{ de hembras}}$$

La variable de interés “proporción de machos” se analizó con un modelo lineal generalizado mixto, asumiendo una distribución Binomial para la variable respuesta condicionada a los efectos aleatorios:

$$Y_{ijkl} | f, r \sim \text{independientes Binomial } (p_{ijkl})$$

$$\text{Logit}(p_{ijkl}) = T_i + G_j + TG_{ij} + f_{k(i)} + r_{l(k)}$$

$$f \sim \text{indN}(0, \sigma_f^2)$$

$$r \sim \text{indN}(0, \sigma_r^2), p = \text{proporción de machos.}$$

La parte fija del modelo consideró el efecto del tipo de cría (T), efecto de la generación (G) y la interacción entre ambos (TG). La parte aleatoria consideró el efecto de la familia (f) y de la réplica dentro de cada familia (r) para incorporar en el modelo la correlación entre observaciones de la misma familia y de la misma réplica dentro de la familia.

- **ENSAYO 2: Verificación de la existencia de machos diploides mediante recuento cromosómico en hijos descendientes de cruzamientos madre x hijo**

ENSAYO 2.1 Establecimiento de los cruzamientos

Se dispusieron individualmente en frascos de vidrio provistos de agua y una traza de miel, 15 hembras vírgenes obtenidas según ENSAYO 1.1. Cuando alcanzaron los siete días de edad, se les ofrecieron larvas de *C. capitata* en unidades de oviposición de metal de 1,5 cm de diámetro y 0,5 cm de profundidad. Luego de cuatro horas, las larvas se acondicionaron y se individualizaron según la hembra a la cual fueron expuestas. Posteriormente a la emergencia de todos los hijos, se eligió uno aleatoriamente y se lo colocó con su madre. Dos días después se realizó otra exposición de larvas de *C. capitata*.

ENSAYO 2.2 Preparaciones cromosómicas

Durante los días 11, 12 y 13, después de la exposición de *C. capitata*, se disecaron todas las pupas y se realizaron preparaciones cromosómicas de los testículos de los hijos en estadio de larva 3, prepupa, pupa y adulto farado. Las preparaciones se realizaron por dispersión en plato caliente a 45 °C de acuerdo con el protocolo descrito por Sahara y colaboradores (1999), con algunas modificaciones que se detallan a continuación:

1. Disecar las gónadas bajo microscopio binocular estereoscópico colocando al ejemplar sobre una cápsula de Petri con parafina en solución fisiológica fría (Glaser 1917).
2. Pretratar las gónadas disecadas con solución hipotónica durante 10 - 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Fijar las gónadas en solución de Carnoy 6:3:1 (etanol: cloroformo: ácido acético glacial) fresca durante 15 minutos.
4. Colocar las gónadas en una gota de ácido acético 60 % (7 µl) sobre un portaobjetos de vidrio, previamente incubado en una solución de HCl 1 / en etanol 96 / .
5. Dilacerar los tejidos empleando agujas de tungsteno.
6. Colocar la preparación cromosómica sobre el plato caliente a 45 °C y dispersar la gota con la aguja de tungsteno sobre el portaobjeto, cubriendo una superficie rectangular del tamaño de un cubreobjetos de 24 x 24 mm, hasta que la gota se haya evaporado casi por completo. El resto se descarta apoyando el portaobjetos sobre papel absorbente.
7. Deshidratar las preparaciones cromosómicas en una serie de alcoholes de concentración creciente (etanol 70 / , 80 / y 100 /), durante 30 segundos cada uno. Dejarlas secar.
8. Revisar las preparaciones cromosómicas bajo microscopio óptico de contraste de fase Olympus BX40.

ENSAYO 2.3 Análisis cromosómico de los descendientes

Las preparaciones cromosómicas se observaron bajo microscopio óptico de contraste de fases Leica DMLB con sistema de epifluorescencia y equipado con una cámara fotográfica digital Leica DFC 350 FX CCD y el software Leica IM50 versión 4.0 (1992-2004) (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK).

ENSAYO 2.4 Tinción con el fluorocromo 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

En caso de detectar machos diploides, las preparaciones se tiñeron con el fluorocromo DAPI para tener un mejor detalle de la morfología cromosómica y poder realizar un conteo más fidedigno. A continuación se detallan los pasos involucrados en el protocolo de tinción:

1. Lavar las preparaciones en una solución de Tritón X-100 1 / en 2x SSC en un baño con agitación a 25 °C durante 5 minutos.
2. Teñir con DAPI (Fluka BioChemika, Sigma Aldrich Production GmbH, Buchs, Switzerland) 0,1 µg / ml en una solución de Tritón X-100 1 / en 2x SSC en un baño con agitación a 25 °C durante 15 minutos.
3. Lavar con Kodak PhotoFlo 1 / en 2x SSC en un baño con agitación a 25 °C durante 4 minutos.
4. Lavar con Kodak PhotoFlo 1 / en H₂O bidestilada en un baño con agitación a 25 °C durante 1 minuto.
5. Montar con 30 µl de medio de montaje (Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y cubrir con un cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm.
6. Distribuir homogéneamente el medio de montaje, evitando la formación de burbujas y eliminar el excedente realizando una ligera presión con papel absorbente.
7. Sellar el cubreobjetos con esmalte de uñas.
8. Conservar a 4 - 8 °C en caja oscura durante al menos 24 horas antes de la observación bajo microscopio de epifluorescencia.

ENSAYO 2.5 Análisis estadístico

La cantidad total observada de machos diploides y hembras se comparó con los valores de machos y hembras esperados bajo los modelos de alelos complementarios en un locus y en dos, tres y cuatro loci, mediante un análisis de chi-cuadrado de bondad de ajuste con un grado de libertad. La cantidad esperada de machos diploides se calculó multiplicando la cantidad total de descendientes diploides por la frecuencia de machos diploides esperada para cada modelo: un locus (0,50), dos loci (0,25), tres loci (0,125) y cuatro loci (0,0625). Las frecuencias esperadas se calcularon considerando segregación independiente y al azar de los alelos en los loci sexuales (no ligamiento) e igual probabilidad de fecundación de los espermatozoides portadores de cada una de las variantes alélicas. Sólo se consideraron dos alelos en cada locus ya que el uso de hembras vírgenes y su cruzamiento con un hijo, limita la cantidad de alelos a ese número. La cantidad esperada de hembras se calculó restando la cantidad de machos diploides al total de descendientes diploides.

- **ENSAYO 3: Descripción del cariotipo por las técnicas de bandas C, impregnación argéntica (bandas AgNOR), bandas secuenciales fluorescentes (DAPI/CMA₃) y de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con una sonda específica de ADN ribosomal (ADNr)**

ENSAYO 3.1 Bandas C

Se analizaron entre dos y 10 metafases meióticas de 10 machos, y entre dos y 10 metafases oogoniales y paquitenes de 10 hembras del parasitoide. Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de gónadas de machos y hembras en estado de pupa, por dispersión en plancha caliente según el protocolo descrito en ENSAYO 2.2.

El protocolo para la obtención de las bandas de heterocromatina constitutiva se describe a continuación:

1. Deshidratar los preparados en soluciones de concentración creciente de etanol (70 / – 80 / – 100 /), sumergiéndolos 30 segundos en cada una. Dejarlos secar.
2. Incubar en HCl 0,2 N a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Incubar en solución saturada de hidróxido de bario (Ba (OH)₂ 5 /) a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Lavar bajo agua corriente en forma enérgica durante un minuto.
5. Incubar en 2x SSC a 60 °C en baño térmico durante 1 hora 30 minutos.
6. Eliminar el excedente de 2x SSC con agua destilada.
7. Dejar secar.
8. Teñir las preparaciones con DAPI según la metodología descrita en ENSAYO 2.4, a fin de tener una mejor definición de las bandas.

ENSAYO 3.2 Impregnación argéntica o bandas AgNOR

Se analizaron metafases, espermatoцитos y espermátidas de 10 machos del parasitoide. Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de gónadas de individuos en estado de pupa, por dispersión en plancha caliente según el protocolo descrito en ENSAYO 2.2.

Se utilizó la técnica descrita por Stack y colaboradores (1991) con modificaciones:

1. Colocar 50 µl de solución acuosa de nitrato de plata 25 / en agua destilada pH 3 sobre la preparación cromosómica.
2. Cubrir la gota con un cuadrado de tela de nylon de 1,5 cm de lado.
3. Incubar los preparados en baño térmico a 60 °C durante 50 minutos.
4. Sacar la tela de nylon agitando vigorosamente el portaobjetos en un contenedor con agua destilada.
5. Dejar secar.
6. Hacer las preparaciones permanentes con medio de montaje para histología DPX (Fluka BioChemika, Sigma Aldrich Production GmbH, Buchs, Switzerland).

ENSAYO 3.3 Bandas fluorescentes DAPI/CMA₃

Se analizaron entre dos y seis metafases de 10 machos del parasitoide. Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de gónadas de estado de pupa, por dispersión en plancha caliente según el protocolo descrito en ENSAYO 2.2.

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

1. Deshidratar las preparaciones cromosómicas en alcohol etílico 70 / frío durante dos minutos, luego en alcohol etílico 80 / y alcohol etílico 100 / durante 30 segundos cada uno. Dejar secar a temperatura ambiente.
2. Colocar las preparaciones en un vaso de Koplín con metanol a temperatura ambiente durante dos horas. Dejar secar a temperatura ambiente.
3. Lavar las preparaciones con Buffer McIlvaine (pH 7,0).
4. Colocar 75 µl de una solución de DAPI en Buffer McIlvaine (concentración final 0,1 µg / ml). Cubrir con cubreobjeto plástico 24 x 50 mm e incubar en oscuridad en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 20 minutos.
5. Lavar alternando agua destilada (asegurarse de retirar el cubreobjetos), buffer McIlvaine, agua destilada. Entre lavado y lavado retirar el exceso de líquido golpeando el portaobjetos contra la pared de la bandeja.
6. Colocar 50 µl de una solución de CMA₃ 0,6mg/ml (Fluka BioChemika, Sigma Aldrich Production GmbH, Buchs, Switzerland) en Buffer Mc Ilvaine en oscuridad. Colocar un cubreobjeto plástico 24 x 50 mm e incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora.
7. Lavar alternando agua destilada (asegurarse de retirar el cubreobjetos), Buffer Mc Ilvaine, agua destilada. Entre lavado y lavado retirar el exceso de líquido golpeando el portaobjetos contra la pared de la bandeja.
8. Colocar el preparado sobre papel absorbente y dejar secar a temperatura ambiente.
9. Colocar 30 µl de medio de montaje Vectashield, colocar un cubreobjeto de vidrio de 24 x 40 mm, retirar el exceso con papel filtro y sellar con pegamento UHU.
10. Dejar en oscuridad a 4 °C durante una semana o a 37 °C durante 3 días.

ENSAYO 3.4 Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) con ADNr

Se analizaron entre tres y siete metafases meióticas de nueve machos, y entre tres y siete metafases oogoniales y paquitenes de cuatro hembras del parasitode. Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de gónadas de machos y hembras en estado de pupa, por dispersión en plancha caliente según el protocolo descrito en ENSAYO 2.2.

Para la hibridación *in situ* fluorescente se utilizaron sondas autólogas de la secuencia 18S de los genes ribosomales de *D. longicaudata*, generadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores diseñados sobre la secuencia completa del gen de ADNr de la subunidad 18S de *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera, Pyralidae) por Fuková y colaboradores (2005), cuya secuencia es 18S-Gal forward 5'-CGATACCGCGAATGGCTCAATA-3' y 18S-Gal reverse 5'-ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC-3'. La PCR se realizó en un termociclador Mastercycler® Gradient Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). Las reacciones se realizaron utilizando como templado ADN genómico total extraído a partir de individuos adultos de *D. longicaudata* mediante el protocolo descrito en Baruffi y colaboradores (1995). El producto de PCR mostró una banda única de aproximadamente 1000 pb en gel de agarosa 1 / en buffer TBE 0,5x. La banda se recuperó del gel y se purificó utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Byodínamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina). La sonda de ADNr se marcó por Nick translation con 14-dUTP biotinilados (BioNick Labeling System, Invitrogen Life Technologies Inc., Buenos Aires, Argentina).

La técnica de FISH se realizó según Sahara y colaboradores (1999) con modificaciones descritas en Fuková y colaboradores (2005) y Bressa y colaboradores (2009):

ENSAYO 3.4.1 Desnaturalización de la sonda e hibridación

1. Mezclar en un tubo de centrífuga de 1,5 ml la sonda marcada (5 - 50 ng / preparación cromosómica), ADN de esperma de salmón (2,5 μ l = 25 μ g / preparación) y agua ultra pura.
2. Agregar 1/10 de volumen de acetato de sodio (CH₃COONa) 3M y 2,5 volúmenes de alcohol etílico 100/ . Mezclar cuidadosamente.
3. Precipitar a -80 °C durante 60 minutos.
4. Centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y lavar con 400 μ l de etanol 70 % frío.
6. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.
7. Descartar el sobrenadante con ayuda de una micropipeta a fin de remover la mayor cantidad posible. Centrifugar brevemente a 13.000 rpm y dejar secar destapado a 37 °C durante 3 minutos.
8. Disolver el pellet obtenido en formamida deionizada (precalentada a 37 °C) e incubar en baño térmico a 37 °C durante 30 minutos (5 μ l / preparación).
9. Agregar sulfato de dextrano 20 / (precalentado a 37 °C) (5 μ l / preparación) y mezclar en un vórtex.
10. Desnaturalizar la mezcla de hibridación a 90 °C en baño térmico durante 5 minutos.
11. Enfriar inmediatamente en hielo. Incubar por al menos 3 minutos.

ENSAYO 3.4.2 Pretratamiento de las preparaciones cromosómicas y desnaturalización

1. Deshidratar los preparados en alcohol etílico 70 / frío durante dos minutos, alcohol etílico 80 / y alcohol etílico 100 / durante 30 segundos cada uno. Dejar secar.
2. Colocar 200 μ l de ARNasa A (100 μ g / ml en 2x SSC), cubrir con un cubreobjetos plástico de 24 x 50 mm e incubar a 37 °C en cámara húmeda durante 60 minutos.
3. Remover el cubreobjetos plástico cuidadosamente y realizar dos lavados en 2x SSC a 25 °C en un baño térmico con agitación durante 15 minutos cada vez.
4. Incubar las preparaciones en solución Denhart 5x a 37 °C en baño térmico con agitación durante 30 minutos.
5. Sacar las preparaciones de la solución, drenando el excedente de líquido y secando la parte de atrás del preparado.
6. Desnaturalizar cada preparación en formamida 70 / (100 μ l por preparación), cubriendo con un cubreobjetos de vidrio de 24 x 50 mm, en un plato caliente a 72 °C durante tres minutos y medio.
7. Remover el cubreobjetos y deshidratar las preparaciones en alcohol etílico 70 / frío durante dos minutos, y en alcohol etílico 80 / y alcohol etílico 100 / a temperatura ambiente durante 30 segundos cada uno. Dejar secar a temperatura ambiente.

ENSAYO 3.4.3 Hibridización

1. Agregar 10 μ l de la mezcla de hibridación en cada preparación.

2. Colocar un cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm, presionar para distribuir la mezcla homogéneamente.
3. Sellar los bordes con cemento de contacto.
4. Incubar a 37 °C en cámara húmeda durante toda la noche (“overnight”).

ENSAYO 3.4.4 Lavados

1. Retirar cuidadosamente el cemento de contacto con pinza y remover el cubreobjetos en 2x SSC.
2. Lavar las preparaciones en la siguiente serie de soluciones en baño térmico con agitación a 42 °C:
 - a. en una solución de 2x SSC durante 10 minutos.
 - b. en una solución de formamida 20 / en 0,1x SSC durante 10 minutos.
 - c. en una solución de 0,1x SSC durante 5 minutos.
 - d. en una solución de Tween 20 0,2 / en 4x SSC durante 5 minutos.
3. Lavar dos veces en una solución de Tween 20 0,2 / en 4x SSC a temperatura ambiente en un rotador durante 5 minutos cada uno.

ENSAYO 3.4.5 Detección de la sonda (en oscuridad, luz roja)

1. Agregar en cada preparación 150 µl de solución de suero fetal bovino (SFB) 5 / en 4XSSC / Tween 20 0,2 / , colocar un cubreobjetos de plástico de 24x50 mm e incubar en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos.
2. Retirar el cubreobjetos y agregar 50 µl en cada preparación de una solución de estreptavidina conjugada a Cy3 en SFB 5 / (0,16 µl / 50 µl de SFB 5 /), colocar un cubreobjetos de plástico de 24 x 24 mm e incubar en cámara húmeda en oscuridad a 37 °C durante 60 minutos.
3. Remover el cubreobjetos sumergiendo los preparados en una solución de Tween 20 0,2 / en 4x SSC.
4. Lavar tres veces en una solución de Tween 20 0,2 / en 4x SSC en baño térmico con agitación a 37 °C durante 3 minutos cada uno.

ENSAYO 3.4.6 Tinción con DAPI a 25 °C en baño termostaticado con agitación

1. Lavar en una solución de Tritón X-100 1 / en PBS durante 5 minutos.
2. Teñir en una solución de Tritón X-100 1 / en PBS conteniendo 40 µl de DAPI (concentración final 0,1 µg / ml) durante 15 minutos.
3. Lavar en una solución de Kodak PhotoFlo 1 / en PBS durante 4 minutos.
4. Lavar en una solución de Kodak PhotoFlo 1 / en agua ultra pura durante 1 minuto.
5. Drenar el contenido excesivo de líquido, pero no dejar secar.
6. Agregar 30 µl de medio de montaje Vectashield por preparación, quitar el exceso de medio de montaje con un papel de filtro y evitar que se formen burbujas de aire.
7. Colocar un cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm.
8. Sellar con esmalte de uñas.
9. Conservar a 4 – 8 °C en oscuridad.

ENSAYO 3.5 Captura de imágenes

Las preparaciones cromosómicas se observaron bajo microscopio óptico Leica DMLB con sistema de epifluorescencia y equipado con una cámara fotográfica digital Leica DFC 350 FX CCD y el software Leica IM50 versión 4.0 (1992-2004) (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK). Las imágenes de los cromosomas y de las células en los distintos estadios en blanco y negro se registraron separadamente para cada fluorocromo. Las imágenes fueron pseudocoloreadas (azul claro para DAPI, amarillo para CMA₃ y rojo para Cy3) y procesadas utilizando un programa de procesamiento de imágenes.

El tamaño cromosómico, índice centromérico y cantidades relativas de heterocromatina y eucromatina se midieron utilizando el programa MicroMeasure versión 3.3 (disponible en línea en <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/Micromasure>) (Reeves & Tear 2000).

- **ENSAYO 4: Análisis del comportamiento cromosómico durante la meiosis en machos y hembras, utilizando la heterocromatina constitutiva como marcador citogenético**

ENSAYO 4.1 Preparaciones cromosómicas

Las preparaciones cromosómicas se realizaron por dispersión en plato caliente a partir de gónadas de machos y hembras en estado de pupa o adulto farado, según el protocolo descrito en ENSAYO 2.2.

ENSAYO 4.2 Bandas C

Se analizaron células interfásicas de 10 machos y 10 hembras del parasitoide. El protocolo para la obtención de las bandas de heterocromatina constitutiva se describe en ENSAYO 3.1.

ENSAYO 4.3 Captura de imágenes

Las preparaciones cromosómicas se observaron bajo microscopio óptico Leica DMLB con sistema de epifluorescencia y equipado con una cámara fotográfica digital Leica DFC 350 FX CCD y el software Leica IM50 versión 4.0. Las imágenes de los cromosomas en blanco y negro fueron grabadas, pseudocoloreadas (azul claro para DAPI) y procesadas utilizando un programa de procesamiento de imágenes.

- **ENSAYO 5: Estudio de la espermatogénesis en la especie**

ENSAYO 5.1 Realización de las preparaciones cromosómicas

Los individuos a analizar se obtuvieron a partir de una exposición de larvas de *C. capitata* a hembras vírgenes del parasitoide. Las preparaciones se realizaron diariamente, por aplastado, iniciando el análisis con material en estadio de larva 3 temprana (cinco días luego de la exposición) y hasta la emergencia de los machos adultos. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Disecar los testículos en solución fisiológica.
2. Fijar las gónadas en solución fijadora fresca 3:1 (etanol absoluto: ácido acético) durante 20 minutos.

-
3. Transferir a un portaobjetos con una gota de hematoxilina férrica acética y utilizando como mordiente citrato férrico.
 4. Cubrir con un cubreobjetos de 24 x 24 mm y realizar presión verticalmente.
 5. Una vez logrado el nivel de aplastado deseado, sellar el preparado con cera.

ENSAYO 5.2 Captura de imágenes

Las preparaciones cromosómicas se observaron bajo un microscopio óptico Leica DMLB con sistema de epifluorescencia y equipado con una cámara fotográfica digital Leica DFC 350 FX CCD y el software Leica IM50 versión 4.0. Las imágenes de los cromosomas en blanco y negro fueron grabadas y procesadas utilizando un programa de procesamiento de imágenes.

RESULTADOS

- **Estudio de la proporción de sexos secundaria en líneas de alta endogamia, generadas a partir del cruzamiento de una hembra virgen y su hijo (ENSAYO 1)**

La cantidad de hijos e hijas, y la proporción de machos obtenida por réplica, por generación, tanto para endogamia como para exogamia se presenta en la Tabla 4. Una de las hembras vírgenes (Familia 13) murió antes de llegar a ser cruzada con su hijo, por lo tanto se contó con 14 familias para el tratamiento de alta endogamia. En la primera generación de endogamia, la réplica B de las familias 2 y 4 produjeron sólo machos y sólo hembras respectivamente, llevando a la extinción de las réplicas por la imposibilidad de crear parejas. En la segunda generación de endogamia se perdieron ambas réplicas de la familia 15, ya que no se obtuvieron descendientes; la réplica A de las familias 3 y 4 se perdieron ya que sólo produjeron machos. En la tercera generación de endogamia se perdió la réplica B de la familia 10, ya que no se obtuvieron descendientes; la réplica B de la familia 11 sólo produjo machos. En la cuarta generación de endogamia se perdieron la réplica A de la familia 5 y la réplica B de la familia 8, ya que no se obtuvieron descendientes. En lo que respecta a los controles exogámicos, en la tercera generación sólo se obtuvieron descendientes en dos de las diez parejas analizadas.

Los datos se grafican en la Figura 12. Los valores representados en el gráfico por generación para el tratamiento de endogamia, se corresponden con el promedio entre los valores de proporción de machos obtenidos por familia, que a su vez se calcularon promediando las réplicas dentro de ellas. En el caso del tratamiento control exogámico el valor graficado es el promedio entre los valores obtenidos para las parejas exogámicas analizadas en cada generación (10 para las generaciones 1, 2 y 4, y dos para la generación 3). Cada punto del gráfico presenta las barras de error estándar correspondientes. Como se mencionó en el párrafo anterior, el control correspondiente a la tercera generación, sólo contó con dos datos, ya que ocho familias no dieron descendientes. Por esta razón la barra de error es significativamente más grande que para los otros puntos de las curvas.

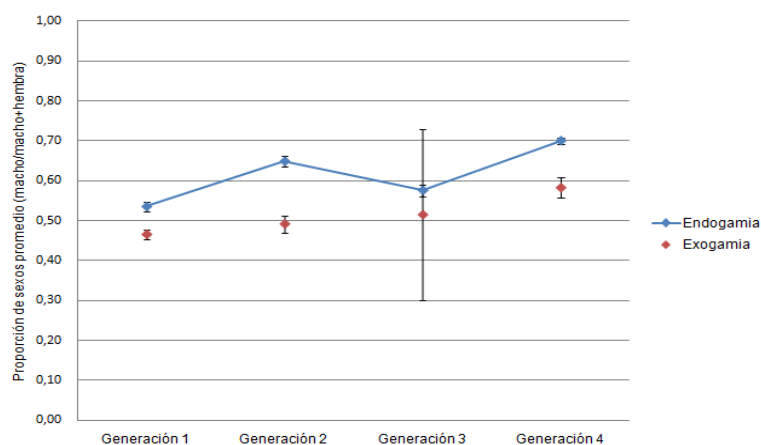


Figura 12. Proporción de sexos promedio (\pm error estándar) para los tratamientos de endogamia y exogamia, para cada una de las cuatro generaciones analizadas.

El análisis estadístico para la estimación de las varianzas de los efectos aleatorios para la variable “proporción de machos” arrojó los siguientes resultados:

Familia (f) = 0

Réplica en Familia (r) = 0,00895

Residual = 0,02444

Los valores de probabilidad para el análisis de los efectos fijos dieron los siguientes resultados:

Tipo de cría (T) (exogamia o endogamia) = 0,0258

Generación (G) = 0,0174

Interacción Tipo de cría – Generación (TxG) = 0,8335.

Como la interacción es estadísticamente no significativa, el modelo pudo simplificarse descartándola del análisis, y obteniéndose los siguientes resultados:

Tipo de cría (T) (exogamia o endogamia) = 0,0068

Generación (G) = 0,0011

Los resultados indican que existe un efecto estadísticamente significativo del tipo de cría sobre la proporción de machos generados. Al ocurrir un incremento en la endogamia, la producción de machos es mayor y por ende aumenta dicha proporción.

- **Verificación de la existencia de machos diploides mediante recuento cromosómico en hijos descendientes de cruzamientos madre por hijo (ENSAYO 2)**

Diez de los 12 cruzamientos realizados produjeron descendientes de ambos sexos, indicando que la hembra fue fertilizada. Los resultados obtenidos por pareja se presentan en la Tabla 5.

Se cariotiparon entre tres y 21 machos por línea. Se realizaron en total 108 preparaciones cromosómicas, de las cuales, 49 correspondieron a machos haploides ($n = 20$ cromosomas) (Figura 13 a), 6 a machos diploides ($2n = 40$ cromosomas) (Figura 13 b), nueve se registraron como machos haploides pero con mayor grado de incertidumbre, ya que no se encontraron suficientes metafases para contar, y otros nueve se catalogaron como machos diploides bajo las mismas circunstancias. El resto de los individuos (35) no presentaron células en metafase, por lo que no fue posible determinar su nivel de ploidía por conteo cromosómico.

Estos datos indican que, en promedio, 15,53 / de los machos descendientes de un cruzamiento madre por hijo, son machos diploides. Asimismo, estos individuos representan 11,45 / de la totalidad de la descendencia diploide.

Los valores observados y esperados de machos diploides y hembras, y los resultados obtenidos del análisis de chi-cuadrado se presentan en la Tabla 6. Considerando un valor estadístico de referencia de 3,841, correspondiente a un grado de libertad, estos resultados indican que las cantidades totales obtenidas se corresponden a las esperadas bajo un modelo de alelos complementarios con un promedio de 3 loci independientes.

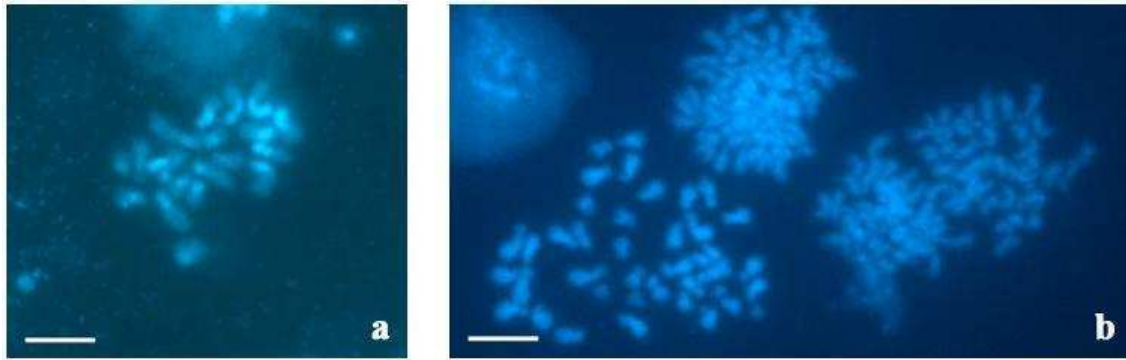


Figura 13. Preparaciones obtenidas por dispersión en plancha caliente de gónadas de machos descendientes de cruzamientos madre por hijo. (a) metafase de macho haploide, (b) metafase y dos anafases de macho diploide. Barra = 10 μm .

- **Descripción del cariotipo de *D. longicaudata* por las técnicas de bandas C, impregnación argéntica (AgNOR), bandas secuenciales fluorescentes (DAPI/CMA₃) y de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con una sonda específica de ADN ribosomal (ADNr) (ENSAYO 3)**

ENSAYO 3.1 Bandas C

En las metafases de machos y hembras, todos los cromosomas presentan bandas C-positivas en la región pericentromérica. En sólo 13 cromosomas del complemento haploide ($n = 20$) y en 26 del complemento diploide ($2n = 40$) dichas bandas abarcan la totalidad del brazo corto, confirmando la presencia de cromosomas pseudoacrocéntricos en esta especie. Además, en 11 cromosomas del complemento haploide y en 20 del complemento diploide la heterocromatina constitutiva se extiende hasta la mitad del brazo largo (Figura 14 a y b). En células en paquitene se reconocen 20 bivalentes y en todos ellos las regiones pericentroméricas son C-positivas (Figura 14 c).

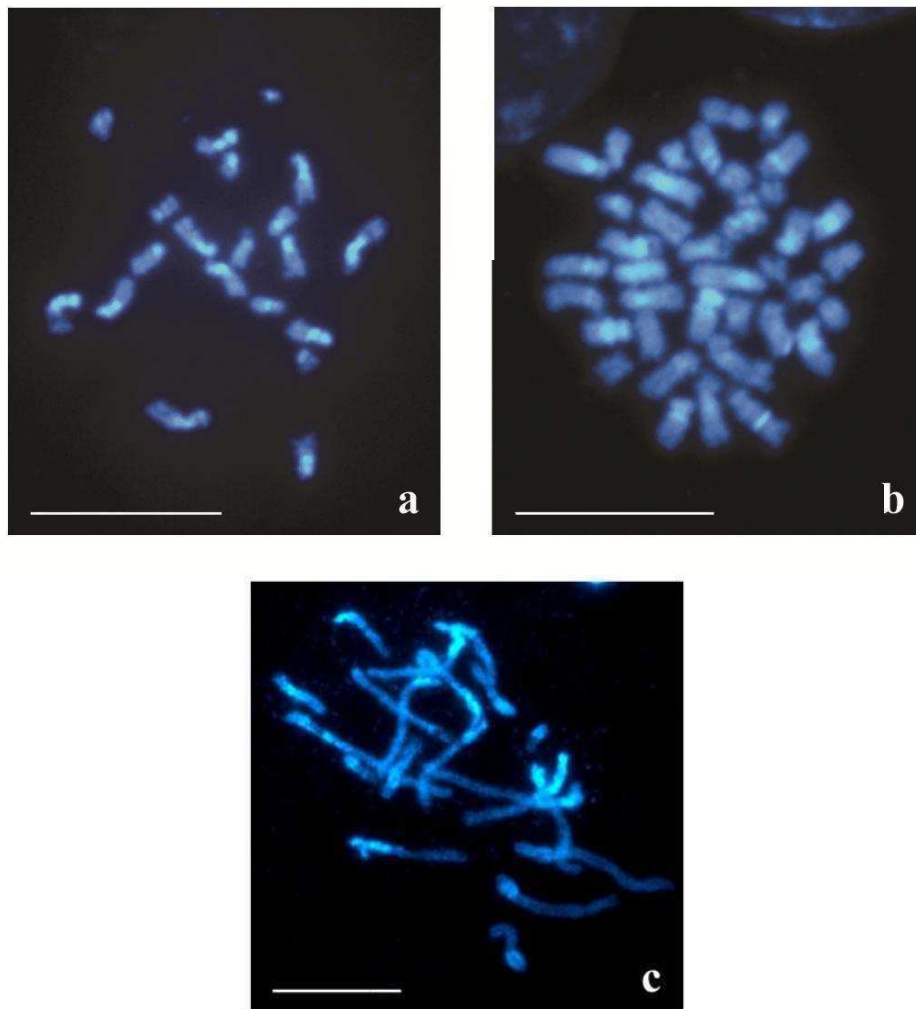


Figura 14. Preparaciones obtenidas por dispersión en plancha caliente a partir de gónadas en individuos en estado de prepupa, tratadas por la técnica de bandas C y teñidas con DAPI (azul). (a) Metafase masculina, (b) metafase femenina, (c) paquitene. Barra = 10 μ m.

Se realizó un idiograma de los cromosomas en metafase del complemento haploide de la especie incluyendo la proporción de heterocromatina de cada cromosoma. De acuerdo a la nomenclatura propuesta por Imai (1991) para la descripción de cariotipos caracterizados por bandas C, *D. longicaudata* tiene $n = 20$ cromosomas = $10 A^{Mc} + 3 A^M + 2 A^{ec} + 5 M^c$ (diez cromosomas metacéntricos – submetacéntricos con brazo corto heterocromático y heterocromatina pericentromérica, tres cromosomas pseudoacrocéntricos, dos cromosomas acrocéntricos – submetacéntricos con ambos brazos eucromáticos y heterocromatina pericentromérica, cinco cromosomas metacéntricos – submetacéntricos con heterocromatina pericentromérica) (Figuras 8 y 15).

El análisis del contenido de heterocromatina mostró que el 40,19 % del cariotipo de *D. longicaudata* está compuesto por heterocromatina constitutiva.

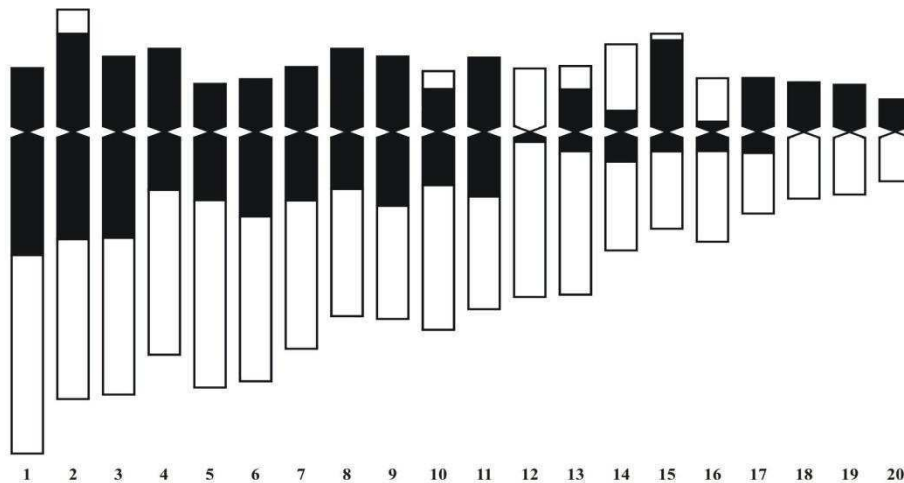


Figura 15. Idiograma de *D. longicaudata*. Negro: heterocromatina, blanco: eucromatina.

ENSAYO 3.2 Impregnación argéntica o bandas AgNOR

No se pudieron detectar fehacientemente bandas AgNOR positivas en las metafases de los machos analizados (Figura 16 a y b). Debido al tamaño pequeño de los cromosomas, no pudieron identificarse correctamente las señales ya que las regiones que se tiñeron más oscuras colocalizaron con los segmentos heterocromáticos. Sin embargo, de una a tres señales positivas se identificaron tanto en espermátidas como en espermatoцитos (Figura 16 c y d).

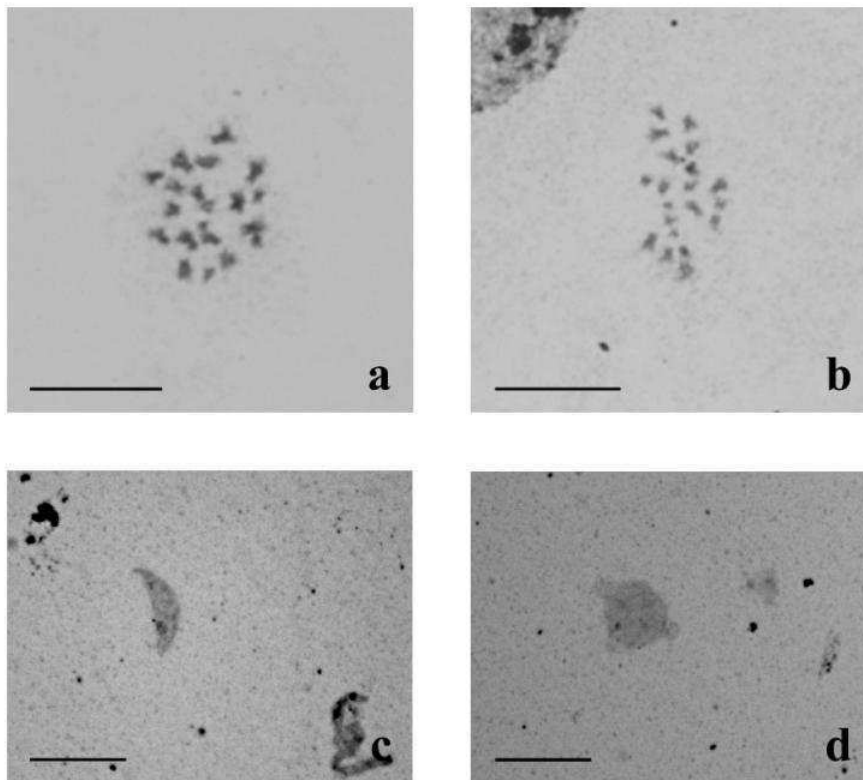


Figura 16. Preparaciones obtenidas por dispersión en plancha caliente a partir de testículos de individuos en estado de prepupa, tratadas con nitrato de plata. (a y b) Metafases sin señales claras, (c) espermátida con una banda NOR, y (d) espermatoцитo con una señal NOR. Barra = 10 μ m.

ENSAYO 3.3 Bandas fluorescentes DAPI/CMA₃

Las señales positivas de ambos fluorocromos colocalizaron en el núcleo interfásico (Figura 17 a y b), pero se detectaron diferencias cuando las bandas se estudiaron en metafases. En 17 de los 20 cromosomas que conforman el complemento cromosómico masculino, las bandas DAPI/CMA₃ colocalizaron, mientras que en el resto, dos cromosomas presentan su brazo largo DAPI y CMA₃ positivo y su brazo corto DAPI negativo (Figura 17 c y d, cabezas de flechas), y el cromosoma restante es enteramente negativo para los dos fluorocromos (Figura 17 c y d, flechas).

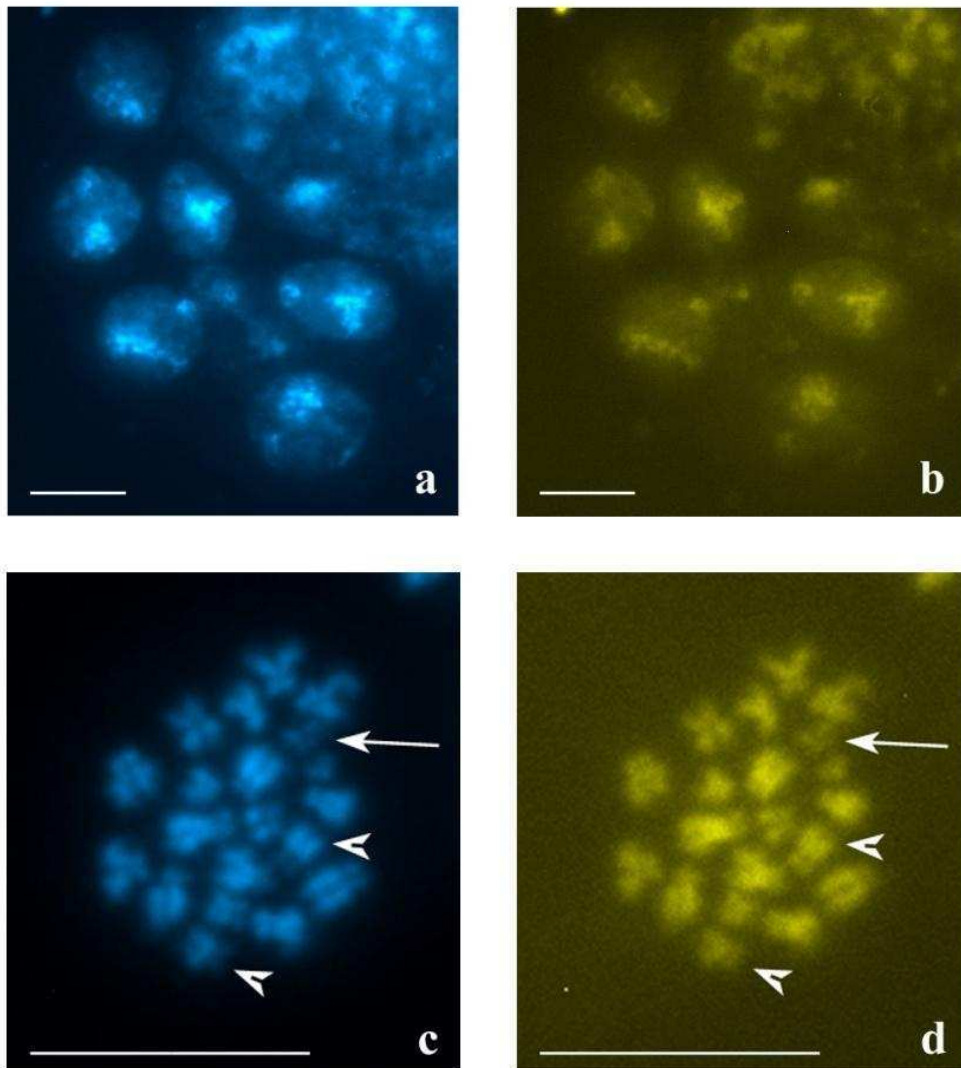


Figura 17. Preparaciones obtenidas por dispersión en plancha caliente a partir de testículos de individuos en estado de prepupa, tratados con la técnica de bandas fluorescentes DAPI/CMA₃. (a) Núcleo interfásico teñido con DAPI (azul), (b) núcleo interfásico teñido con CMA₃ (amarillo), (c) metafase teñida con DAPI, y (d) metafase teñida con CMA₃. Barra = 10 μm. Flecha: cromosomas DAPI⁻/CMA₃⁻. Cabezas de flechas: cromosomas con el brazo largo DAPI⁺/CMA₃⁺ y el brazo corto DAPI⁻.

ENSAYO 3.4 Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) con ADNr

La hibridación con sondas autólogas de la secuencia 18S de ADNr reveló seis regiones organizadoras nucleolares (NOR) en el complemento haploide (Figura 18 a – c). Hay seis cromosomas portadores de genes ribosomales, todos ellos en el brazo corto y en regiones heterocromáticas. Los cromosomas mostraron dos señales de hibridación fuertes, dos medianas y dos de baja intensidad. La localización de estas señales en el complemento haploide se incluyó en el idiograma de la especie (Figura 19).

El mismo patrón de intensidades y distribución se observó en los paquitenes analizados, aunque las señales fueron menos conspicuas debido a la falta de condensación de los bivalentes (Figura 18 d – e).

Este estudio constituyó la primera descripción de la distribución de sitios NOR en la familia Braconidae, empleando una sonda autóloga, y el primer análisis en la especie, utilizando la metodología de hibridación *in situ* fluorescente.

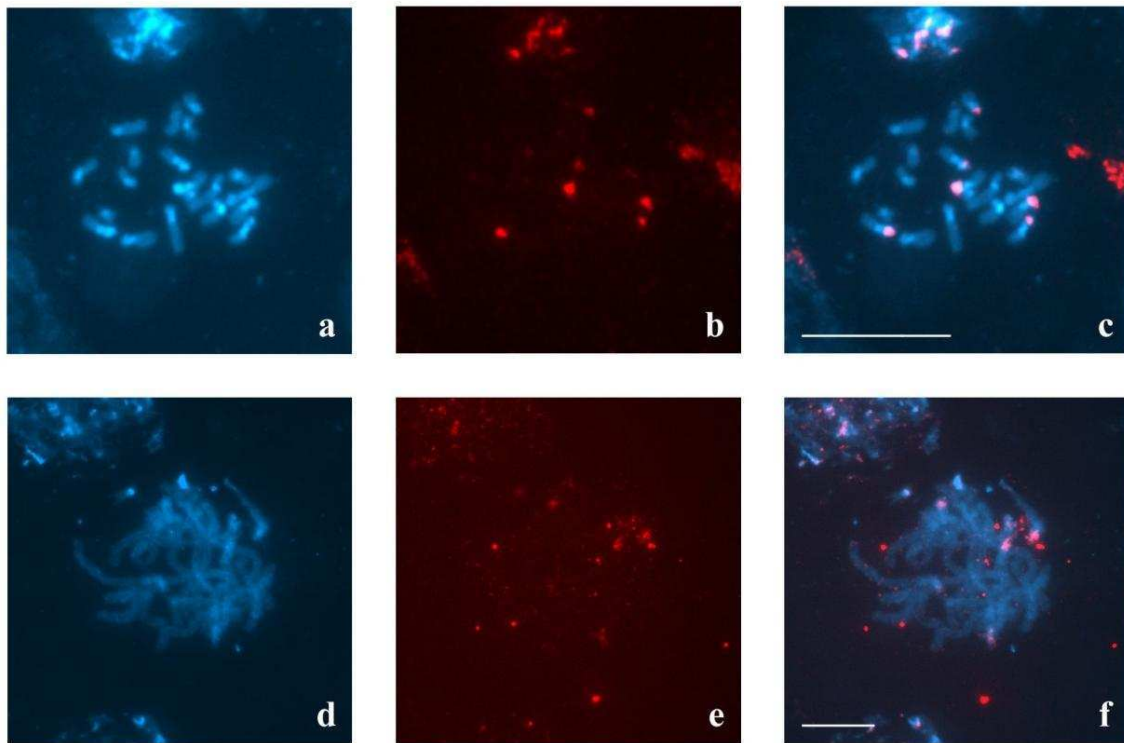


Figura 18. Preparaciones obtenidas por dispersión en plancha caliente a partir de testículos y ovarios de individuos en estado de prepupa. FISH con sonda de ADNr 18S marcada con Cy3. (a) Metafase de macho teñida con DAPI (azul), (d) paquitene teñido con DAPI, (b y e) señales de hibridación con Cy3 (rojo), y (c y f) fusión. Barra= 5 μ m.

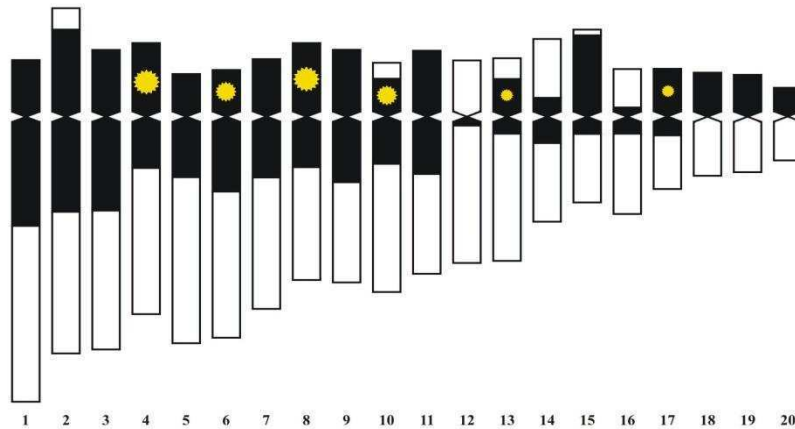


Figura 19. Idiograma de *D. longicaudata*. Negro: heterocromatina, blanco: eucromatina, puntos amarillos: señales de hibridación con ADNr (su tamaño representa la intensidad de la fluorescencia).

- **Análisis del comportamiento cromosómico durante la meiosis en machos y hembras, utilizando la heterocromatina constitutiva como marcador citogenético (ENSAYO 4)**

Las interfases goniales mostraron un patrón diferencial en la distribución de la heterocromatina constitutiva en machos y hembras. En los machos sólo se observan dos o tres puntos heteropícnóticos positivos (Figura 20 a), mientras que en las interfases oogoniales la heterocromatina aparece completamente dispersa en el núcleo (Figura 20 b).

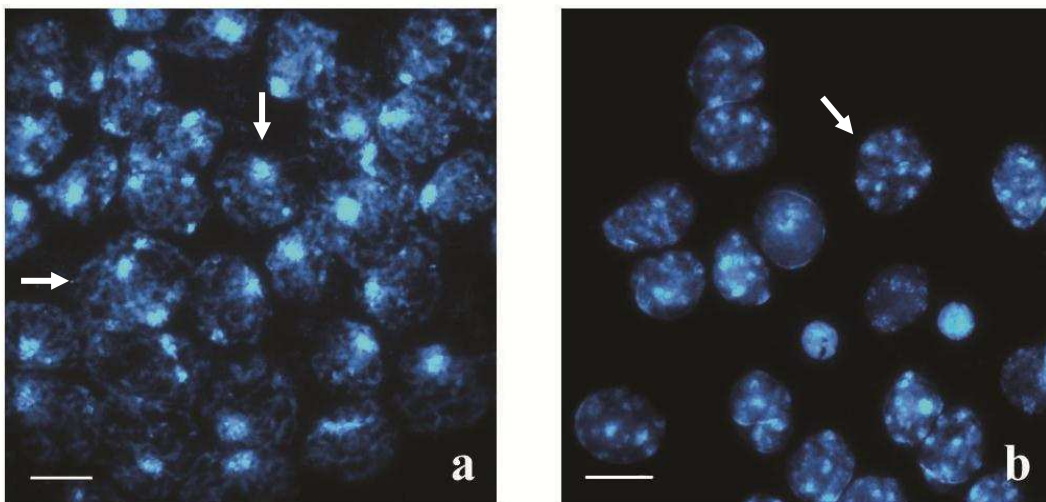


Figura 20. Preparaciones obtenidas por dispersión en plancha caliente a partir de gónadas de individuos en estado de prepupa. (a) Núcleos interfásicos de machos, y (b) núcleos interfásicos de hembras. Barra = 10 μ m. Flecha: (a) señala núcleos interfásicos con dos y tres regiones heteropícnóticas positivas; (b) señala núcleo interfásico con regiones heterocromáticas dispersas.

- **Estudio de la espermatogénesis en la especie (ENSAYO 5)**

Las observaciones realizadas durante el estudio de la espermatogénesis de *D. longicaudata* se correlacionan con las esperadas bajo un sistema con una meiosis I abortiva y una meiosis II con división ecuacional de las cromátidas.

Al momento de iniciar la elaboración de preparaciones los individuos se encontraron en el estadio de larva 3. Se observaron metafases espermatogoniales caracterizadas por presentar cromosomas de tamaño pequeño (Figura 21 a), también se identificaron anafases mitóticas (Figura 21 b). A continuación las células aumentan su tamaño y se observan núcleos redondeados con aspecto puntilloso que se corresponderían a una profase meiótica I (Figura 21 c). Los puntos heteropicnóticos positivos se agrupan formando uno o dos focos que se disponen hacia uno de los lados del núcleo (Figura 21 d). A medida que avanza el proceso la célula adquiere una forma de “pera” con el núcleo hacia un lado y una protuberancia citoplasmática hacia el otro (Figura 21 e). Sin mediar un estadio claro de profase II, comienzan a distinguirse cromosomas en metafase II, de mayor tamaño que los cromosomas de metafases mitóticas y que presentan dos cromátidas (Figura 21 f). A continuación comienza el proceso de maduración de las espermátidas, que pasan de tener una sección redondeada (Figura 21 g) a una más ahusada (Figura 21 h, i), hasta llegar a la formación de espermatozoides maduros de morfología filiforme (Figura 21 j).

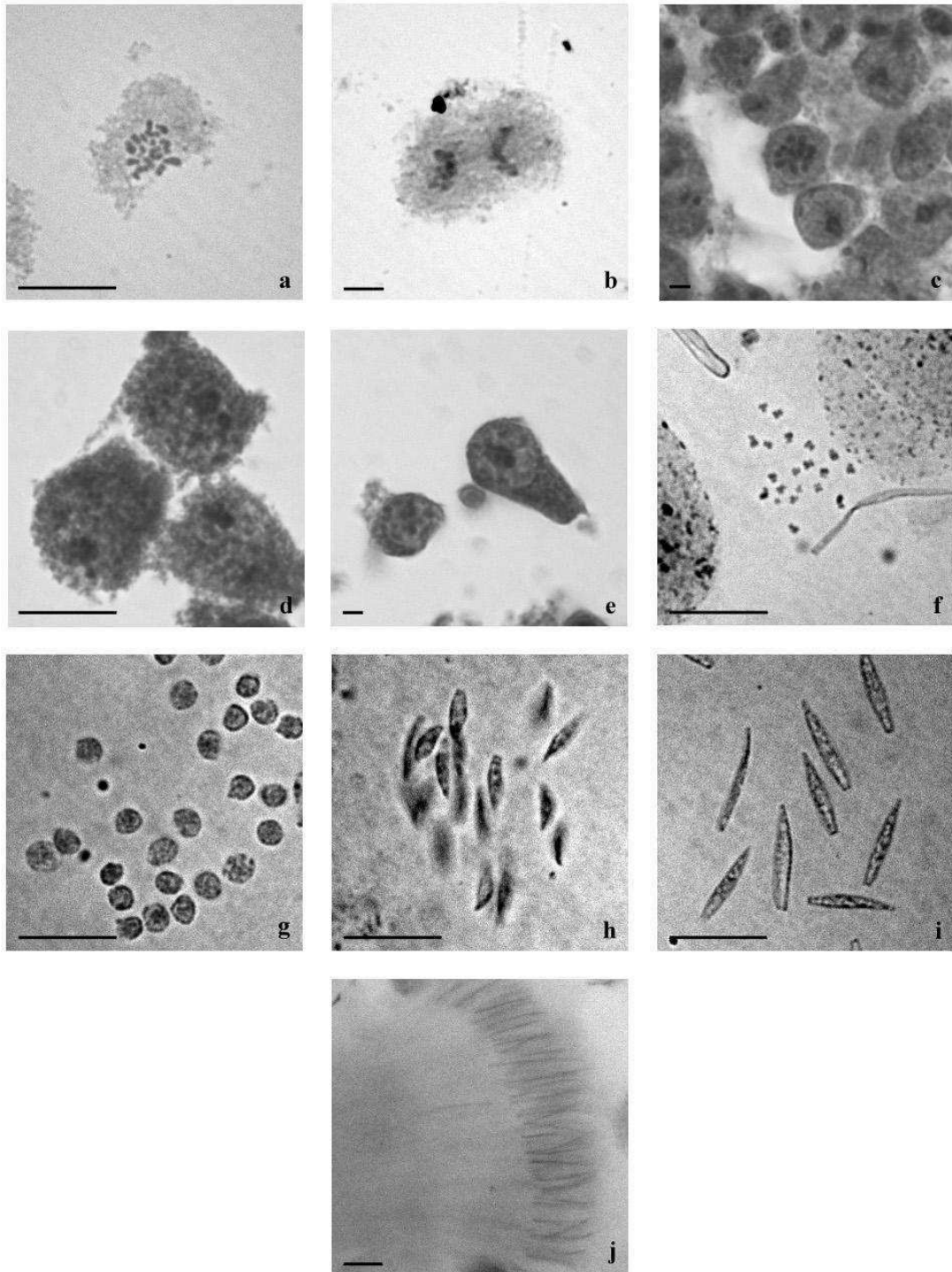


Figura 19. Estadios de la espermatogénesis en *D. longicaudata*. (a) Metafase espermatogonial, (b) anafase mitótica, (c) profase meiótica con regiones heteropicnóticas positivas, (d) célula con núcleo redondo y focos heteropicnóticos positivos, (e) célula alargada con forma de “pera”, (f) metafase II, cromosomas con dos cromátidas cada uno, (g) espermátida temprana, (h) espermátida intermedia, (i) espermátida tardía, (j) espermatozoides. Barra = 10 μm .

DISCUSIÓN

- **Determinación del sexo en *Diachasmimorpha longicaudata***

A lo largo de la historia, los procesos embriológicos de determinación del sexo han sido un gran interrogante que se ha intentado resolver de formas muy diferentes. La determinación del sexo resulta en el desarrollo de individuos con características que les permiten ser identificados como machos, hembras, o en algunos casos, hermafroditas (Hake & O'Connor 2008). El primer avance importante en la comprensión de la determinación del sexo fue el descubrimiento de los cromosomas sexuales en el año 1900. Desde el análisis minucioso de los cromosomas de insectos machos y hembras, los científicos descubrieron que, aunque la mayoría de cromosomas están presentes en igual número en machos y hembras, había uno o dos cromosomas adicionales que han estado representados de forma desigual en los dos sexos. Los análisis de nuevas especies en los últimos años han puesto de manifiesto que las diferencias cromosómicas son los principales responsables de la determinación del sexo en la mayoría de los animales (Hake & O'Connor 2008). Por otro lado, durante las últimas décadas, el estudio de los mecanismos de determinación del sexo en organismos de reproducción sexual ha jugado un papel clave para entender la biología evolutiva (Salin et al. 2004).

Los insectos son la clase más diversa de organismos en el planeta, por lo que no es demasiado sorprendente que muestren una considerable diversidad en sus mecanismos de determinación del sexo (Saccone et al. 2002). Además, han desempeñado un papel fundamental en la comprensión de la diversidad de los sistemas genéticos y su evolución, desde la primera demostración de partenogénesis en áfidos (Suomalainen et al. 1987) hasta la elucidación de los conflictos intragenómicos (Howard & Lively 1994, Werren & Beukeboom 1998, Normark 2003). Los Hymenoptera muestran una gran variedad de sistemas sociales y relaciones de sexo y han jugado un papel clave en el desarrollo y comprobación de modelos de la evolución (Cook & Crozier 1995).

El interés acerca de la determinación del sexo en los insectos himenópteros es de larga data, debido a la ausencia de cromosomas sexuales heteromórficos y a su modo de reproducción más predominante, la arrenotoquia: los machos son haploides y se desarrollan por partenogénesis de óvulos no fertilizados, mientras que las hembras son diploides y se desarrollan de huevos fertilizados. En este orden de insectos el género macho o hembra está regulado por el mecanismo de determinación sexual haplodiploidia, el cual da a la hembra un alto grado de control sobre la proporción de sexos de su descendencia, ya que durante el proceso de oviposición ella controla la fertilización o no de sus huevos, dando origen a hembras o machos, respectivamente; por ejemplo, a través de la liberación de los espermatozoides almacenados en la espermateca, en función del tamaño de la larva hospedera (Godfray 1994). Este modo de determinación del sexo fue descubierto por Johann Dzierzon, un sacerdote católico, en 1845. Su informe fue la primera descripción rigurosa de un sistema de determinación del sexo, 50 años antes del descubrimiento de los cromosomas sexuales (McClung 1902, Wilson 1905).

Además, este mecanismo tiene consecuencias importantes para la evolución de los sistemas de apareamiento, la ecología de poblaciones y la evolución del carácter social (Charnov 1982, Cook & Crozier 1995, Pen & Weissing 2002, West et al. 2002). Sin embargo, muchas especies también producen regularmente machos diploides (Cook & Crozier 1995). La

primera descripción de machos diploides en Hymenoptera se realizó en *Bracon hebetor* Say (Braconidae) por Whiting & Whiting en 1925; desde entonces se han descrito en otras 11 especies de la misma familia: *Aphidius rhopalosiphi* (De Stefani Pérez) (Salin et al. 2004), *Bracon brevicornis* (Wesmael) (Speicher & Speicher 1940), *Bracon serinopae* (Cherian) (Clark et al. 1963), *Cotesia rubecula* (Marshall) (van Wilgenburg et al. 2006), *Microplitis croceiceps* (Cresson) (Steiner & Teig 1989), *Asobara tabida* (Nees) (Beukeboom et al. 2000), *Alysia manducator* (Panzer) (Beukeboom et al. 2000), *Cotesia glomerata* (Linnaeus) (Gu & Dorn 2003), *Cotesia flavipes* (Cameron) (Niyigibira et al. 2004), *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Niyigibira et al. 2004) y *Heterospilus prosopidis* (Viereck) (Wu et al. 2005).

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral constituyen el primer antecedente de machos diploides en el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*. Estos resultados sientan precedente sobre el impacto de la endogamia en el nivel de productividad de este parasitoide en biofábrica, debiendo ser considerado al momento de desarrollar protocolos de cría y manejo (Stouthamer et al. 1992).

Los machos diploides suelen ser no viables o eliminados de la población durante sus estados inmaduros. Si estos individuos llegan al estado adulto, no son fértiles, o bien, debido a la producción de esperma diploide, pueden generar hembras triploides estériles (van Wilgenburg et al. 2006). En el caso de los machos diploides del parasitoide *D. longicaudata*, los individuos alcanzan un estado de desarrollo inmaduro relativamente avanzado, detectándose especímenes hasta el estado de adulto farado (último estado de desarrollo sobre el cual se realizaron las preparaciones cromosómicas).

El hecho de haber demostrado la existencia de machos diploides para *D. longicaudata* bajo condiciones de endogamia y, por otro lado, el efecto significativo de la endogamia sobre la proporción de sexos al sesgarla hacia machos, apoya la teoría de determinación del sexo por alelos complementarios.

Los valores obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral concuerdan con los esperados bajo un sistema de determinación del sexo por alelos complementarios de un promedio de tres loci sexuales. Los dos aspectos que se tuvieron en cuenta al momento de determinar la cantidad de loci involucrados en el sistema son:

1) Del total de los hijos descendientes de cruzamientos madre por hijo se determinó el número cromosómico en 67,59 / (73 de 108 individuos), mientras que en 32,41 / restante (35 de 108 individuos) no pudo analizarse el cariotipo. A pesar de ello, el número total de individuos que pudo estudiarse resultó ser una muestra representativa.

2) El estudio se llevó a cabo a partir de un material científico con una base genética estrecha, dado que:

a. No se contó con poblaciones salvajes de *D. longicaudata* por ser originaria de Asia.

b. Esta especie sufrió numerosos cuellos de botella debido a su mantenimiento en condiciones artificiales semimasivas desde 1999, tanto en Tucumán como en Castelar; a las alteraciones en las condiciones de temperatura y humedad que ocurren en invierno y verano y, por último, a los inconvenientes en el funcionamiento del equipamiento responsable de mantener las condiciones ambientales de cría.

c. El material que se importó hacia Tucumán fue una muestra de la cría masiva mantenida en México, cuya fecha de fundación y cantidad de inyecciones de material salvaje no pudo ser determinada.

Contemplando estas limitantes, es factible que algunos de los loci sexuales se encuentren en homocigosis en la población estudiada, lo cual lleva a una subestimación de la cantidad de loci involucrados en la determinación sexual, causando el colapso del sistema desde un modelo de alelos complementarios con más loci a uno de menos.

Además, el modelo establece que el individuo diploide será hembra si al menos uno de sus loci es heterocigota. Como no puede evaluarse el genotipo de la hembra, la misma puede tener un locus, dos, tres, cuatro, etc. loci heterocigotas, lo cual se refleja en la varianza de los datos obtenidos. Por tal razón, se utilizaron los totales al momento de poner a prueba el modelo, con el fin de obtener un valor promedio de loci involucrados.

La información obtenida en el presente trabajo de Tesis Doctoral sobre el sistema de determinación del sexo en *Diachasmimorpha longicaudata* permitirá mejorar los protocolos implementados actualmente para su cría masiva. El haber demostrado el efecto detrimental de la endogamia sobre la proporción de sexos, sesgándola hacia machos, permitirá tomar las medidas necesarias para mantener el nivel de heterocigosis en el locus sexual lo más alto posible. Para tales fines se pueden mencionar distintas alternativas: i) el mantenimiento de una población lo suficientemente grande como para mantener una gran variabilidad de alelos sexuales, o ii) el mantenimiento de pequeñas poblaciones, donde aleatoriamente se fijen distintas variantes, pero que en conjunto representen la variabilidad esperada en una población de gran tamaño (Stouthamer et al. 1992).

- **Análisis citogenético de *Diachasmimorpha longicaudata***

- **Número cromosómico**

Kitthawee y colaboradores (1999,2004) describieron el cariotipo mitótico de machos y hembras de *D. longicaudata* a partir de ganglio cerebral de individuos en estado de prepupa, y a partir de testículos y ovarios de adultos farados. Los autores concluyeron que, ya que los ganglios cerebrales son pequeños y es difícil manipularlos, se obtienen mejores resultados a partir de gónadas. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, las preparaciones cromosómicas realizadas a partir de gónadas, permitieron obtener más información sobre las características citogenéticas de esta especie debido al nivel de elongación de sus cromosomas espermatozonales y oogonales.

Dentro del orden Hymenoptera se considera como cariotipo ancestral al constituido, predominantemente, por cromosomas metacéntricos y submetacéntricos. Además, teniendo en cuenta que las avispas parasíticas con valores cromosómicos generalmente altos pertenecen a taxa menos avanzados de la superfamilia Ichneumonoidea, estos valores altos ($n = 14 - 17$) son considerados plesiomórficos (Gokhman 1997a). En particular, en varios linajes de la familia Braconidae se observaron números cromosómicos más bajos como resultado de múltiples reducciones, $n = 8 - 11$ y luego $n = 5 - 7$ (Gokhman 2009).

El análisis de la variación de los números cromosómicos en las avispas parasíticas pertenecientes a Braconidae muestra que prevalecen valores diferentes en las tres principales ramas filogenéticas del grupo. Los números entre 14 y 20 son característicos de los Braconidae ciclostomos (Subfamilias Doryctinae, Opiinae y Alysiinae), entre 3 y 9 son predominantes en Alysiinae (grupo hermano de los Braconidae ciclostomos) y entre 5 y 11 para los Braconidae no-ciclostomos (Subfamilias Meteorinae, Microgastrinae, Cheloninae, etc.) (Gokhman 2004) (Figura 6).

A partir del análisis citogenético realizado en el presente trabajo de Tesis y del análisis comparativo con otras especies de Braconidae, se concluye que *Diachasmimorpha longicaudata* presenta un cariotipo masculino con un alto número cromosómico ($n = 20$ cromosomas) compuesto mayoritariamente por cromosomas con brazo corto y largo, siendo algunos de ellos pseudoacrocéntricos y que este número cromosómico es concordante con la distribución de números cromosómicos descripta precedentemente.

Contenido y composición de la heterocromatina constitutiva

De las aproximadamente 170 especies de Ichneumonoidea analizadas citogenéticamente, sólo dos especies de Braconidae fueron estudiadas por la técnica de bandas C: *Apanteles* sp. ($n = 11$) (Hoshiba & Imai 1993) y *Aphidius ervi* (Haliday) ($n = 5$, $2n = 10 - 12$) (Gokhman & Westendorff 2003). En la primera especie mencionada el cariotipo está compuesto por $n = 11$ cromosomas = $1A^M + 9A^i + 1M$, i.e. un cromosoma pseudoacrocéntrico, uno acrocéntrico – submetacéntrico con heterocromatina intersticial y un cromosoma metacéntrico con ambos brazos eucromáticos). En la segunda especie, la única descripción disponible corresponde a la de un par extra de cromosomas acrocéntricos completamente heterocromáticos y con un comportamiento meiótico diferencial, únicamente en un grupo de hembras. En el parasitoide *D. longicaudata* la técnica de bandas C realizada en este trabajo de Tesis, permitió la caracterización de sus cromosomas, observándose $n = 10 A^{Mc} + 3 A^M + 2 A^{ec} + 5 M^c$, lo cual indica que su contenido de heterocromatina es superior al de las otras dos especies de braconidos.

Se ha descrito la presencia de un gran contenido de heterocromatina constitutiva en algunos taxa animales como Diplopoda (Vitturi et al. 1997), Coleoptera (Juan & Petitpierre 1989, Pohl et al. 1993, Bruvo et al. 1995), Hymenoptera (Gomes et al. 1998) y Amphibia (King 1980, Schmid et al. 1988). La distribución de heterocromatina constitutiva en los cromosomas juega un papel importante en la diferenciación de los cariotipos (Rocha & Pompolo 1998). Por lo tanto, la diversidad cariotípica puede deberse a la variabilidad de las regiones heterocromáticas a lo largo de los cromosomas (Hoshiba & Imai 1993, Rocha et al. 2003, Costa et al. 2004). El incremento en el contenido de heterocromatina del cariotipo de una especie puede ser explicado por adición intersticial y pericentromérica, a través de la amplificación de la heterocromatina, o por incorporación/agregado de heterocromatina nueva. La técnica de bandas secuenciales fluorescentes DAPI/CMA₃ provee un análisis de la complementariedad de los segmentos de heterocromatina constitutiva, indicando si tienen o no orígenes independientes (Domingues et al. 2005).

A partir del análisis de los resultados obtenidos en *D. longicaudata* mediante la técnica de bandas C y bandas fluorescentes DAPI/CMA₃, se observó la presencia de un sólo cromosoma completamente eucromático y negativo para ambos fluorocromos, respectivamente. Por ello, se sugiere que el cromosoma totalmente C negativo se corresponde con el cromosoma DAPI/CMA₃ negativo (Cromosoma 12). Por todo lo expuesto, se concluye que este cromosoma carece de heterocromatina constitutiva. El resto del complemento presentó bandas DAPI positivas que colocalizaron con las bandas CMA₃ positivas; por lo tanto, se concluye que estas bandas fluorescentes son regiones ricas en pares de bases AT y GC. Por último, en base a los resultados, se sugiere que la heterocromatina constitutiva en *Diachasmimorpha longicaudata* tiene un origen común, producto de la amplificación.

Distribución de los “clusters” de genes ribosomales

La mayoría de las regiones NOR en los genomas eucariotas están situadas en regiones particularmente ricas en heterocromatina (Goessens 1984, Hadjiolov 1985, Babu & Verma 1987), probablemente debido a que las estructuras asociadas a la heterocromatina sirven para silenciar algunas repeticiones y suprimir la recombinación entre ellas (Gottlieb & Esposito 1989). Los genes ribosomales tienen una gran propensión a la auto-duplicación y crecimiento (Rousselet et al. 1999), dado que se necesitan en grandes cantidades y, por ende, la amplificación en la cantidad de genes ribosomales parece ser una adaptación evolutiva (Long & Dawid 1980).

En cuanto a las herramientas que pueden utilizarse para el estudio de determinación del número y la localización de ADNr, el FISH constituye la única metodología que detecta de manera precisa las secuencias de genes ribosomales (Vitturi et al. 1999). La tinción con plata y con CMA₃ son metodologías indirectas basadas en la detección de las proteínas ácidas asociadas a los loci de ADNr o de su riqueza en bases GC.

Cuando se aplica la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con una sonda de ADNr, las diferencias en la intensidad de las señales de hibridación reflejan las diferencias en el número de repeticiones de los genes (Appels et al. 1980, Wachtler et al. 1986, Leitch & Heslop-Harrison 1992). La presencia de varios “clusters” ribosomales en el complemento cromosómico haploide fue descrita para insectos (Hirai et al. 1994), mamíferos (Gosden et al. 1978, Suzuki et al. 1992) y peces (Pendas et al. 1993).

En la Tabla 7 se detalla la cantidad de “clusters” de ADNr detectados por FISH en distintas especies de Hymenoptera. El número de señales de hibridación observadas por complemento diploide varía entre dos (en 10 de las 17 especies analizadas hasta el momento) y 19 (*Myrmecia arnoldi* (Clark), Formicidae). La cantidad de loci de ADNr y el número de genes en cada locus varía no sólo entre especies sino también entre poblaciones y entre individuos (Lorite et al. 1997). Ejemplo de esta variabilidad es el caso de *D. longicaudata* y *Cotesia congregata* (Say), ambas pertenecientes a Braconidae. La primera presenta 12 señales de hibridación en el complemento diploide, mientras que la segunda especie sólo posee dos señales de hibridación en su complemento cromosómico (Belle et al. 2002). Otro ejemplo es el de *Partamona helleri* (Fries) (Hymenoptera, Apidae), cuyo número cromosómico diploide es $2n = 34$ cromosomas y presenta seis y ocho señales de hibridación en dicho complemento (Brito et al. 2005).

Hasta el presente, dentro de la familia Braconidae, *C. congregata* ha sido la única especie en la cual se ha estudiado mediante FISH la localización de las secuencias de ADNr 18S, 5,8S y 28S, utilizando una sonda heteróloga de *Drosophila melanogaster* (Linnaeus) (Diptera, Drosophilidae) (Belle et al. 2002). Por tal motivo, es importante señalar que los resultados obtenidos en esta Tesis de Doctorado mediante la técnica de FISH constituyen el primer antecedente para esta familia con una sonda autóloga de ADNr.

Rousselet y colaboradores (1998, 1999) detectaron las regiones NOR activas mediante la técnica de impregnación argéntica (AgNOR) en la hormiga *Tapinoma nigerrimum* (Nylander) (Hymenoptera, Formicidae). Esta técnica mostró regiones positivas en varios cromosomas, adyacentes a las regiones centroméricas y coincidentes con los sitios de heterocromatina constitutiva (Palomeque et al. 1988, Lorite et al. 1997). Sin embargo, sólo se reveló una señal de hibridación por la técnica de FISH. De acuerdo a los autores, esto podría

deberse a la presencia de un bajo número de copias de los genes ribosomales, las cuales no pudieron ser detectadas por la sonda (Lorite et al. 1997).

En *D. longicaudata*, los resultados de la técnica de impregnación argéntica revelaron la presencia de bandas AgNOR que colocalizan con las regiones de heterocromatina pericentromérica. Esto puede explicarse ya que el nitrato de plata se une a las proteínas ácidas asociadas a los ribosomas y no directamente a los genes ribosomales (Miller et al. 1976, Goessens 1984, Hernández-Verdún 1986), lo cual produce un patrón de bandas AgNOR similar al de bandas C. Estos resultados también pueden ser explicados por la gran capacidad de tinción con plata de las proteínas ricas en residuos ácidos en las regiones libres de genes ribosomales (Sumner 1990, Sánchez et al. 1995, Hirai et al. 1996, Dobigny et al. 2002). Aún más, la tinción con plata de la heterocromatina se observó en varias especies incluyendo trigo (Murray et al. 1992), el erizo *Athelixerix algirus* (Lereboullet) (Insectivora, Erinaceidae) (Sánchez et al. 1995), e insectos como *T. nigerrimum* (Rousselet et al. 1998, 1999) y algunas especies de Coleoptera (Vitturi et al. 1999, Colomba et al. 2004).

La variabilidad en la capacidad de tinción a lo largo del ciclo celular fue descrito en la hormiga *Myrmecia croslandi* (Taylor) (Hymenoptera, Formicidae). Hirai y colaboradores (1994) observaron que las regiones NOR no se teñían con el nitrato de plata durante la profase mitótica y metafase, mientras que sí se teñían los cinetocoros. Lo mismo fue observado por Imai y colaboradores (1992) en *Myrmecia pilosula* (Smith) (Hymenoptera, Formicidae), quienes postularon que los genes ribosomales se inactivan completamente durante la división celular, y las partículas de nitrato de plata no pueden unirse a las proteínas (Sumner 1990), o que los nucleolos de las hormigas carecen de los centros fibrilares observados en *Drosophila* (Knibiehler et al. 1982). En el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* los únicos estadios del ciclo celular donde se detectaron de una a tres marcas con plata fueron espermatocitos y espermátidas, constituyendo esta especie otro ejemplo de esta variabilidad en la capacidad de tinción.

En insectos como Orthoptera (Camacho et al. 1991), Coleoptera (Maffei et al. 2001) e Hymenoptera (Formicidae, Sphecidae y Meliponini) (Costa et al. 2004), las bandas positivas con DA/CMA₃ (Distamicina/Cromomicina A₃) estarían asociadas con las regiones NOR, incluso en el núcleo interfásico (Rocha et al. 2003). Sin embargo, en *D. longicaudata* no se ha puesto en evidencia tal asociación debido a que ninguna de las bandas de heterocromatina constitutiva presentó una composición rica en pares de bases GC (ninguna banda CMA₃ positiva) y dado que las señales de hibridación con las sondas de ADN_r se detectaron en regiones heterocromáticas, se deduce que la unidad de repetición de los genes ribosomales no es rica en dichos pares de bases.

Gametogénesis

Las diferencias en la distribución de la heterocromatina constitutiva en los núcleos interfásicos de machos y hembras de *D. longicaudata* puede deberse a las diferencias en el proceso de gametogénesis que ocurre en ambos sexos. Como se mencionó en la introducción, mientras las hembras producen sus gametas por una meiosis normal, los machos, al ser haploides, producen sus gametas mediante una meiosis modificada (Palomeque et al. 1990). En este caso, los cromosomas no deben reorganizarse en el núcleo interfásico, como sí lo deben hacer en la meiosis femenina, y por lo tanto las asociaciones entre la heterocromatina

pueden mantenerse durante el proceso. Por esta razón, las hembras presentan una heterocromatina más dispersa y los machos presentan uno o dos focos bien definidos.

Todos los modelos de espermatogénesis propuestos incluyen una primera o segunda división abortiva, la formación de una prolongación citoplasmática sin núcleo y una división igual o desigual del citoplasma durante la segunda división, conduciendo a la formación de uno a dos espermatozoides maduros (Patterson & Porter 1917, Dreyfus & Breuer 1944, Crozier 1975, Palomeque et al. 1990, da Cruz-Landim 2001, Moreira et al. 2008). En el caso del parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*, las observaciones se ajustan a un modelo con una primera división abortiva, con la formación de un brote de citoplasma anucleado y una célula nucleada, continuada por una nueva división ecuacional donde se separan las cromátides hermanas, formándose dos espermatozoides maduros.

A medida que avanza el estado de desarrollo del individuo analizado, los distintos estados de división celular comienzan a solaparse, llegando a encontrar metafases espermatogoniales junto con espermatidas y espermatozoides maduros. Esto se debe al carácter moderadamente sinespermatogénico descrito para el parasitoide (Ramadan et al. 1991). Esta característica se refiere a la capacidad de los machos de generar espermatozoides a lo largo de su vida adulta, a diferencia de los machos proespermatogénicos que emergen con una carga completa de espermatozoides, siendo incapaces de producir más (Boivin et al. 2005).

Aportes de la información citogenética obtenida en *D. longicaudata* para el estudio de la evolución del cariotipo en Parasítica

A pesar de la heterogeneidad en la composición de bases, las bandas C comúnmente se asocian inespecíficamente en el núcleo interfásico, lo que puede causar interacciones deletéreas (Hirai et al. 1994). De acuerdo a la Teoría de Interacción Mínima (TIM), la evolución de los cromosomas en eucariontes procede de manera tal que se minimizan estas interacciones. A tal fin, se considera que un incremento en el número cromosómico mediante fisión céntrica es una adaptación evolutiva. Sin embargo, luego de este tipo de reordenamientos, se generan extremos cromosómicos inestables. Estas terminaciones desnudas finalmente se sellan con un telómero generado “de novo” por la enzima telomerasa (Blackburn 1991, Werner et al. 1992, Greider et al. 1993, Richards et al. 1993), por un incremento de la heterocromatina constitutiva (Hirai et al. 1994) mediante duplicación de genes en tándem o replicación (Britten & Kohne 1969) o debido a la presencia de secuencias teloméricas en la región centromérica del cromosoma ancestral (Hall & Parker 1995).

Asimismo, los sitios de heterocromatina constitutiva y los “clusters” de ADNr podrían constituir sitios frágiles y representar puntos de ruptura preferenciales cuando ocurren reordenamientos cromosómicos como las fisiones (Hall & Parker 1995, Cerbah 1997). La TIM toma en cuenta estos hechos e indica que puede generarse también un incremento en la cantidad de loci de ADNr proponiendo una hipótesis que involucra los siguientes eventos evolutivos: i) luego de la fisión céntrica de un cromosoma metacéntrico portador de ADNr, se generan dos cromosomas telocéntricos, ii) en la siguiente etapa de la evolución se produce un crecimiento de las bandas C que trae aparejado un incremento en el número de loci de ADNr al estar localizados en dichos bloques heterocromáticos, originándose un par de cromosomas pseudoacrocéntricos, iii) las fusiones céntricas y/o las inversiones pericentroméricas (que generan cromosomas metacéntricos a partir de cromosomas pseudoacrocéntricos) eliminan el

exceso de ADNr y de bandas C extra (Hirai et al. 1994). Teniendo en cuenta que estas eliminaciones no siempre son efectivas, los ADNr remanentes permanecen en las regiones heterocromáticas pericentroméricas de los cromosomas metacéntricos generados. Por lo tanto, los cromosomas portadores de ADNr tenderán a aumentar en el genoma a medida que el número cromosómico se incrementa mediante fisión céntrica y ocurran inversiones pericentroméricas que restauren la morfología metacéntrica (Hirai et al. 1994).

La presencia de un alto contenido de heterocromatina y de cromosomas pseudoacrocentricos en Hymenoptera, constituye una prueba fehaciente que sirve de sustento para la TIM cuando se explican los procesos involucrados en la evolución cariotípica del orden. Como parte de la presente Tesis Doctoral, los resultados obtenidos de los estudios citogenéticos en *Diachasmimorpha longicaudata* permitieron revelar un alto contenido de heterocromatina, la presencia de cromosomas pseudoacrocentricos, de un alto número de regiones NOR y de un número cromosómico mayor respecto de las especies basales de Braconidae constituyen por sí mismos evidencias fidedignas que promueven esta teoría evolutiva.

Los científicos han trabajado durante cientos de años para comprender los sistemas de determinación sexual. Por ejemplo, en el año 335 AC, Aristóteles propuso que el calor de la pareja durante las relaciones sexuales determinaba el género de un individuo. Si el calor del macho podría abrumar a la frialdad de la hembra, a continuación, un hijo varón se formaba; por el contrario, si la frialdad de la hembra era demasiado fuerte (o el calor del macho era demasiado débil), lo que se formaba era una niña. Estas teorías de Medio Ambiente como mecanismos responsables de la determinación del sexo, fueron populares hasta alrededor de 1900, cuando Wilson y Stevens demostraron la existencia de cromosomas sexuales en los insectos.

La Grecia del Siglo V creía que el sexo venía determinado por el lado del útero en el que el individuo se formaba, y que era posible elegirlo recostándose sobre un lado u otro durante las relaciones.

Aún a finales del siglo XIX se decía que la constitución física, edad, nutrición y medio ambiente de los padres deben ser especialmente considerados en todos los análisis acerca de determinación sexual. Se argumentaba que los factores que favorecían el acumulación de energía y nutrientes predisponían a tener descendencia femenina, mientras que los factores que favorecían la utilización de la energía y nutrientes predisponían para la masculina. En resumen, a lo largo de la historia la ciencia se ha generado un gran abanico de hipótesis en las cuales diferentes factores fueron considerados responsables de la determinación del sexo en las especies, con el fin de establecer cuáles son los elementos tempranos en la ontogenia que son comunes a un sexo y que lo distinguen del otro sexo, incluyendo efectos ambientales o genéticos que actúan en padres y cigotos para influir diferencialmente la probabilidad de producir un macho o una hembra.

Así pues, queda claro que la finalidad de este trabajo de Tesis Doctoral fue contribuir y profundizar en el conocimiento de los mecanismos de determinación del sexo, así como el modo de funcionamiento, usando como modelo al parasitoide braconido Diachasmimorpha longicaudata, perteneciente al orden Hymenoptera.

CONCLUSIONES

-
- 1) El presente trabajo de Tesis Doctoral constituye la primera descripción de machos diploides en el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata*.
 - 2) *Diachasmimorpha longicaudata* presentaría un modelo de determinación del sexo por alelos complementarios con un promedio de tres loci involucrados.
 - 3) Los cálculos de frecuencia esperada de producción de machos diploides permitirán desarrollar protocolos de manejo para mejorar la cría masiva de la especie.
 - 4) El número cromosómico de los machos haploides y hembras analizados se corresponde con el valor previamente descrito en la bibliografía.
 - 5) *Diachasmimorpha longicaudata* presenta un contenido de heterocromatina mayor al de otros miembros de la familia Braconidae.
 - 6) Los resultados de bandas secuenciales fluorescentes son indicativos de un origen común de la heterocromatina constitutiva.
 - 7) La técnica de impregnación argéntica o bandas AgNOR no podría aplicarse de manera satisfactoria en cromosomas metafásicos de especies con alto contenido de heterocromatina, debido a reacciones de tinción inespecíficas.
 - 8) El parasitoide presenta seis loci de genes ribosomales, todos asociados a heterocromatina y sólo dos de ellos son activos.
 - 9) El alto número cromosómico de la especie, así como su alto contenido de heterocromatina, la presencia de cromosomas pseudoacrocentricos y la gran cantidad de regiones organizadoras nucleolares asociadas a heterocromatina, proveen más información a favor de la Teoría de Interacción Mínima propuesta para interpretar la evolución de los cariotipos en Hymenoptera.
 - 10) Los machos de *Diachasmimorpha longicaudata* producen sus gametas mediante una meiosis modificada con una primera división meiótica abortiva y una segunda división meiótica que consiste en la distribución de las cromátides hermanas y la consecuente generación de dos espermatozoides.
 - 11) *Diachasmimorpha longicaudata*, en su carácter de especie de fácil cría artificial, constituye un modelo adecuado para estudios de genética y citogenética.

ANEXO TABLAS

Tabla 1. Comparación entre los distintos modelos de determinación del sexo descriptos para Hymenoptera.

En base a nivel de ploidía	Modelos		Haploide	Diploide	
			Macho	Macho	Hembra
En base a nivel de ploidía	Balance genético		M > F	-	2F > M
	Alelos complementarios (CSD)	Locus simple	Ax	Ax / Ax	Ax / Ay
		Múltiples loci	AxBx	AxBx / AxBx	AxBx/ AyBy
	Balance materno-cigótico		Genes efecto materno	-	Genes cigóticos
En base a diferencias en el genoma	Modelos		Macho	Hembra	
	Impronta genética (Imprinting)	Genoma materno	S inactivo	S inactivo / S activo	
		Genoma paterno	Sólo genoma materno	G. materno + G. paterno	
		Ambos genomas	Sólo genoma materno	G. materno + G. paterno	
	Determinación del sexo por fertilización		Huevos sin fecundar	Huevos fecundados	
Determinación del sexo por “imprinting” genómico de efecto materno		<i>zsd</i> inactivo	<i>zsd</i> activo (padre) / <i>zsd</i> inactivo (madre)		

Tabla 2. Evidencias a favor y en contra de los distintos modelos de determinación del sexo descriptos para Hymenoptera.

Modelos	Evidencias a favor	Evidencias en contra
Balance genético	-	- Existencia de machos diploides. - No existe hasta el momento ningún diseño experimental que permita la demostración del modelo.
Alelos complementarios (CSD)	- En ensayos donde se emplearon líneas de alta endogamia, la frecuencia observada de machos diploides concuerda con la esperada bajo este modelo.	- Ausencia de machos diploides en algunas especies de alta endogamia. - Existencia de hembras partenogenéticas (homocigotas) infectadas con <i>Wolbachia</i> .
Balance materno-cigótico	-	- Existencia de machos diploides. - El modelo no fue probado en Hymenoptera.
Impronta genética	- Agentes de distorsión sexual.	- Existencia de hembras partenogenéticas. - Los resultados obtenidos pueden explicarse por CSD.
Determinación del sexo por impronta genética de efecto materno	- Explica variantes observadas en <i>Nasonia vitripennis</i> (Pteromalidae).	-
Determinación del sexo por fertilización	- Líneas poliploides de <i>N. vitripennis</i> .	- Agentes de distorsión sexual. - Existencia de machos diploides.

Tabla 3. Distribución de la heterocromatina en distintas especies del orden Hymenoptera. La descripción de la distribución de la heterocromatina constitutiva se realiza utilizando la mencionada en los trabajos originales y según Hoshiba & Imai 1993 (Figura 7). Het = heterocromatina, crom = cromosoma/s, pericen = pericentromérica.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia
Apoidea	Andrenidae	<i>Andrena togashii</i>	3	6	1Ac, 1Mc, 1Mi	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Anthophora villosula</i>	-	18	1A, 1Mc, 3M, 4Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Ceratina dentipes</i>	-	34	4Am, 11Amc, 2Mcc	Hoshiba & Imai 1993
	Anthrophoridae	<i>Ceratina flavipes</i>	17	34	10Am, 2Amc, 5Mc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Ceratina japonica</i>	-	34	16Amc, 1Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Ceratina megastigmata</i>	-	34	1Am, 15Amc, 1Mc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Ceratina okinawana</i>	-	34	11Am, 2Amc, 3Mc, 2Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Pithitis smaragdula</i>	14	28	10Am, 4Amc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Xylocopa appendiculata</i>	16	32	4Ac, 6A, 3Ah, 1Mc, 3Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Apis cerana japonica</i>	16	32	1Am, 2Amc, 1Ac, 2A, 2Aec, 1Aeci, 3Mc, 1M, 2Mcc, 1Mcci	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Apis mellifera ligustica</i>	16	32	5Ac, 3A, 1Aec, 1Act, 2Mc, 1M, 2Mcc, 1Mi	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Bombus (Bombus) hypocrita</i>	18	-	4Am, 2A, 1Ami, 6Mc, 2M, 2Mct, 1Mt	Hoshiba & Imai 1993
	Apidae	<i>Bombus (Bombus) ignitus</i>	18	-	4Am, 1Ac, 1A, 1Ai, 5Mc, 3M, 1Mi, 1Mci, 1Mt	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Bombus (Diversobombus) diversus</i>	18	-	1Am, 1Amc, 5Ac, 1A, 1Ai, 1Aci, 2Mc, 1M, 1Mcc, 1Mi, 1Mci, 1Mt, 1Mct	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Bombus (Diversobombus) ussurensis</i>	18	-	3Am, 1A, 1Ai, 3Mc, 4M, 3Mi, 2Mci, 1Mcci	Hoshiba & Imai 1993
<i>Bombus (Megabombus) consobrinus wittenburgi</i>		19	38	6Am, 2Amc, 2A, 7Mc, 3M	Hoshiba & Imai 1993	
<i>Bombus (Pyrobombus) ardens</i>		18	-	3Am, 4Amc, 1Ac, 1A, 5Mc, 1M, 2Mcc, 1Mt	Hoshiba & Imai 1993	

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia
Apoidea	Apidae	<i>Bombus (Thoracobombus) deuteronymus maruhanabachi</i>	23	46	8Am, 1Amc, 5Ac, 2A, 1Aci, 3Mc, 2M, 1Mcc, 1Mct	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Bombus (Thoracobombus) honshuensis</i>	17	34	2Amc, 2Ac, 1Ai, 1Ami, 5Mc, 1M, 1Mcc, 2Mi, 2Mci	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Bombus (Thoracobombus) pseudobaicalensis</i>	17	34	1Amc, 1A, 1Aj, 1Aci, 1Amt, 5Mc, 3Mcc, 2Mi, 2Mci	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Bombus (Thoracobombus) schrenckii</i>	17	34	10Mc, 1M, 5Mi, 1Mci	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Camargoia nordestina</i>	-	34	22A, 12Am	Rocha et al. 2003
		<i>Cephalotrigona capitata</i>	-	34	18A, 16Am	Rocha et al. 2003
		<i>Eufriesea surinamensis</i>	-	-	Bandas intersticiales	Gomes et al. 1998
		<i>Eufriesea violácea</i>	15	30	Bloques de het a lo largo de los crom	Gomes et al. 1998
		<i>Frieseomelitta duaderleini</i>	-	30	4M, 4A, 22Am	Rocha et al. 2003
		<i>Frieseomelitta lánguیدا</i>	-	30	4M, 4A, 22Am	Rocha et al. 2003
		<i>Frieseomelitta varia</i>	-	30	4M, 4A, 22Am	Rocha et al. 2003
		<i>Geotrigona mambuca</i>	15	-	2M, 6A, 7Am	Rocha et al. 2003
		<i>Lestrimelitta limaoo</i>	-	28	6M, 3A, 2Am	Rocha et al. 2003
		<i>Leurotrigona muelleri</i>	8	16	Bajo contenido het en hembras. Sólo en 2 pares: pericen en el par metacéntrico y en el brazo corto del par acrocéntrico	Pompolo & Campos 1996
		<i>Leurotrigona pusilla</i>	-	30	Alto contenido het y en todos los crom. Pericen en 2 submetacéntricos y en el resto en uno de los brazos	Pompolo & Campos 1996
		<i>Melipona asilvai</i>	9	18	Het pericen en pares 1, 2, 4 y 5 (1 y 4 bloques het grandes), par 6 het en brazo corto	Rocha & Pompolo 1998

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia
Apoidea	Apidae	<i>Melipona bicolor bicolor</i>	9	18	Het centromérica en 2 pares, pequeños bloques pericen en otros 2 pares	Rocha & Pompolo 1998
		<i>Melipona capixaba</i>	9	18	ídem <i>M. seminigra fuscopilosa</i> , último par de crom con el menor contenido de het	Rocha & Pompolo 1998
		<i>Melipona captiosa</i>	9	18	ídem <i>M. capixaba</i>	Rocha & Pompolo 1998
		<i>Melipona compressipes</i>	9	18	Het en todo el largo de los crom	Rocha et al. 2007
		<i>Melipona crinita</i>	9	18	Het en todo el largo de los crom	Rocha et al. 2007
		<i>Melipona favosa</i>	9	18	1Am, 1Aci, 3Mc, 1M, 1Mi, 1Mci, 1Mct	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Melipona mandacaia</i>	9	18	Het pericen en pares 1, 2 y 8, pequeños bloques en el resto del complemento	Rocha et al. 2003
		<i>Melipona marginata</i>	9	18	6 pares con het pericen (más visible en 3 de ellos)	Rocha & Pompolo 1998
		<i>Melipona quadrifasciata</i>	9	18	4 pares con bloques visibles centroméricos y pericen (sexto par con het en el brazo corto), 2 pares con bloques más claros alrededor del centrómero	Rocha & Pompolo 1998
		<i>Melipona quinquefasciata</i>	9 a 13	19-22	Het pericen en el brazo corto del único par acrocéntrico del complemento A	Rocha et al. 2007

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia
Apoidea	Apidae	<i>Melipona rufiventris</i>	9	18	Alto contenido de het en regiones intersticiales y extendiéndose a lo largo de uno de los brazos	Lopes et al. 2008
		<i>Melipona scutellaris</i>	9	18	ídem <i>M. seminigra fuscopilosa</i>	Rocha & Pompolo 1998
		<i>Melipona seminigra fuscopilosa</i>	9	18	Het distribuida en casi todo el crom	Rocha & Pompolo 1998
		<i>Melipona subnitida</i>	-	-	Het pericen en el brazo corto del único par acrocéntrico	Rocha et al. 2007
		<i>Mourella caerulea</i>	-	34	11A, 6Am	Rocha et al. 2003
		<i>Nannotrigona sp.</i>	-	34	20A, 14Am	Rocha et al. 2003
		<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	-	34	7Am, 1Ac, 5A, 2Aj, 1Amci, 1Mc, 1M	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	-	34	18A, 16Am	Rocha et al. 2003
		<i>Paratrigona subnuda</i>	-	34	24A, 10Am	Rocha et al. 2003
		<i>Partamona aff. nigrior</i>	17	34	Het pericen	Brito 1998
		<i>Partamona ayllae</i>	17	34	Par 1 con brazo largo heterocromático, el resto con brazo corto heterocromáticos	Brito-Ribon et al. 1999
		<i>Partamona helleri</i>	17	34 (B=0 a 4)	Het pericen	Brito 1998
		<i>Partamona mulata</i>	17	34	Par 1 con brazo largo heterocromático, la mayoría del resto con brazo corto heterocromáticos	Brito-Ribon et al. 1999
		<i>Partamona peckoliti</i>	-	34	Het pericen en todos los crom y un gran bloque en el primer par cromosómico	Brito et al. 2003

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia
		<i>Partamona</i> sp. n.	17	34	Het pericén	Brito-Ribon et al. 1999
		<i>Partamona vicina</i>	17	34	Par 1 con brazo largo heterocromático, la mayoría del resto con brazo corto heterocromáticos	Brito-Ribon et al. 1999
		<i>Plebeia droryana</i>	17	34	11Am, 2A, 1Amt, 1Mc, 2M	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Philotrigona lurida</i>	11		6M+3A+2Am	Rocha et al. 2003
		<i>Scaptotrigona depilis</i>	-	34	26A, 8Am	Rocha et al. 2003
		<i>Scaptotrigona postica</i>	-	34	22A, 12Am	Rocha et al. 2003
		<i>Scaptotrigona</i> sp.	-	34	18A, 16Am	Rocha et al. 2003
		<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	-	34	17A, 17Am	Rocha et al. 2003
		<i>Scaura latitarsis</i>	-	34	14A, 20Am	Rocha et al. 2003
		<i>Schwarziana quadripunctata</i>	-	34	18A, 16Am	Rocha et al. 2003
		<i>Tetragona clavipes</i>	-	34	6A, 28Am	Rocha et al. 2003
		<i>Tetragonisca angustula</i>	-	34	34Am	Rocha et al. 2003
		<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	-	35	16Am, 1M, 1Ah	Lazaroto et al. 2010
		<i>Trigona angustula</i>	-	34	13Am, 1Amc, 1Ac, 1A, 1Mc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Trigona barrocoloralensis</i>	-	34	3Am, 2Amc, 4Ac, 3A, 1Ai, 1Amd, 3Mc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Trigona branneri</i>	17	34	7A, 8Am, 1Mh	Costa et al. 2004
		<i>Trigona chanchamayoensis</i>	17	34	9A, 6Am, 1Mh, 1Ae	Costa et al. 2004
		<i>Trigona fulviventris</i>	-	32	Het pericén en el par metacéntrico mayor, brazo corto del segundo par acrocéntrico, todo el brazo de los crom pseudoacrocéntricos (par 13 pseudoacrocéntrico más fuerte)	Brito et al. 2005
		<i>Trigona hyalinata</i>	17	34	2A, 14Am, 1Ae	Costa et al. 2004
		<i>Trigona minangkabau</i>	20	40	6Am, 1Amc, 3Ac, 3A, 1Ai, 2Mc, 3M, 1Mcc	Hoshiba & Imai 1993

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	Zn	Distribución heterocromatina	Referencia
Apoidea	Apidae	<i>Trigona recurva</i>	17	34	6A, 9Am, 1Mh, 1Ae	Costa et al. 2004
		<i>Trigona recurva</i>	17	34	4A, 30Am	Rocha et al. 2003
		<i>Trigona spinipes</i>	-	34	6A, 28Am	Rocha et al. 2003
		<i>Trigona cfr. fuscipennis</i>	17	-	2A, 15Am	Rocha et al. 2003
	Colletidae	<i>Colletes babai</i>	16	32	12Am, 4Amc,	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Colletes esakii</i>	16	-	6Am, 9Amc, 1Ai,	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Hylaeus nippon</i>	8	-	1Amc, 4Mc, 3M	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Hylaeus</i> sp. 1	18	-	4Mc, 8M, 6Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Hylaeus</i> sp. 2	28	-	25Am, 1Amc, 1M, 1Mcc	Hoshiba & Imai 1993
	Halictidae	<i>Halictus aerarius</i>	14	28	5Am, 9Mc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Lasioglossum allodialum</i>	20	-	13Am, 7Mc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Lasioglossum duplex</i>	9	18	2Mc, 7Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Lasioglossum taenialellum</i>	-	32	4Am, 3Amc, 1A, 2Ah, 6M	Hoshiba & Imai 1993
Megachilidae	<i>Chalicodoma sculpturalis</i>	16	-	N4Am, 8Amc, 4Mcc	Hoshiba & Imai 1993	
	<i>Chalicodoma spissula</i>	16	-	14Am, 1Mc, 1Mct	Hoshiba & Imai 1993	
	<i>Megachile ainu</i>	16	-	16Am	Hoshiba & Imai 1993	
	<i>Megachile pseudomonticola</i>	16	-	7Am, 7Mc, 2Mct	Hoshiba & Imai 1993	
	<i>Osmia cornifrons</i>	16	-	7Ac, 9Mcc	Hoshiba & Imai 1993	
	<i>Osmia lignaria propinqua</i>	16	-	9Am, 7Amc	Hoshiba & Imai 1993	
	<i>Osmia taurus</i>	16	-	15Amc, 1Mcc	Hoshiba & Imai 1993	
	<i>Microstigma arlei</i>	-	6	Het pericen	Costa et al. 1993	
	<i>Microstigma brasiliensis</i>	-	10	Het pericen y todo el brazo corto de todos los crom	Costa et al. 1993	
	<i>Microstigma iuederwaldti</i>	-	6	Het pericen y en todo el brazo corto del tercer par cromosómico	Costa et al. 1993	
Bethylloidea	Crysididae	<i>Omalus diazanus hondonis</i>	19	-	9Am, 9Ai, 9Mc	Hoshiba & Imai 1993

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia	
Ichneumonoidea	Braconidae	<i>Apanteles</i> sp.	11	-	1Am, 9Ai, 1M	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Aphidius ervi</i>	5	10	-		
		<i>Aphidius ervi</i>	-	12	Un par de crom acrocéntricos completamente heterocromáticos	Gokhman & Westendorff 2003	
	Pompiloidea	Ichneumonidae	Gen. sp.	15	30	3Am, 1Ac, 9A, 1Mc, 2M	Hoshiba & Imai 1993
			Gen. sp. 1	15	30	6Mc, 7Mci, 2Mct	Hoshiba & Imai 1993
		Pompilidae	Gen. sp. 2	15	-	6Am, 1Amc, 1Mc, 5M, 1Mi, 1Mit	Hoshiba & Imai 1993
			<i>Carinostigmus filippovi</i>	14	-	2Am, 1Amc, 1A, 4mc, 6Mcc	Hoshiba & Imai 1993
			<i>Chalybion japonicus</i>	24	48	8Am, 14Amc	Hoshiba & Imai 1993
			<i>Ecternius ribicola nipponis</i>	14	28	2Amc, 8Ac, 1Mc, 2Mcc, 1Mct	Hoshiba & Imai 1993
			<i>Pemphredon diervillae</i>	4	8	1A, 3Mcc	Hoshiba & Imai 1993
Sphecoidea	Sphecidae	<i>Pemphredon krombeini</i>	8	-	2Am, 1A, 2Mc, 1M, 1Mi, 1Mcci	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Pemphredon lethifer</i>	8	16	3Ac, 1Ai, 1M, 2Mi, 1Mci	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Psenulus carnifrons iwatai</i>	8	16	7M, 1M	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Psenulus maculipes</i>	21	42	5Am, 4A, 12M	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Rhopalum pygidiale</i>	13	26	4Amc, 4Ac, 1Amct, 2Mc, 2Mcc	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Rhopalum watanabei</i>	13	26	1Am, 1Amc, 6A, 3M, 2Mcc	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Trychofoenus</i> sp.	14	-	8Ac, 4A, 2Mct	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Trypoxylon asuncicola</i>	16	32	Het en uno de los brazos de un crom metacéntrico y uno submetacéntrico, het pericen en par 6	Gomes et al. 1995	
		<i>Trypoxylon fabricator</i>	16	32	Het en uno de los brazos de un crom metacéntrico y uno submetacéntrico, par 16 completamente heterocromático	Gomes et al. 1995	
		<i>Trypoxylon obsinator</i>	-	28	12Ac, 2Mct	Hoshiba & Imai 1993	

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia	
Sphecoidea	Sphecidae	<i>Trypoxylon petiolatum</i>	14	-	6Ac, 6A, 2Mct	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Trypoxylon</i> sp. 1	9	18	1Ac, 2A, 1Mc, 3Mcc, 1Mci, 1Mct	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Trypoxylon</i> sp. 2	13	-	1Am, 1Amc, 8Ac, 1Ai, 1M	Hoshiba & Imai 1993	
Tenthredinoidea	Diprionidae	<i>Diprion pini</i>	14	28	Brazos cortos más fuertemente teñidos, het pericen	Roussellet et al. 1998	
Vespoidea	Eumenidae	<i>Ancistrocerus densepilosus</i>	6	12	6M	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Discoelius japonicus</i>	12	24	5A, 5Ai, 1Mcc, 1Mi	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Euodynerus quadrifasciatus</i>	5	10	1Mc, 2M, 2Mi	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Stenodynerus frauenfeldi</i>	10	20	4Am, 3Ai, 1Ae, 2M	Hoshiba & Imai 1993	
		<i>Apterostigma mayri</i>	-	24	Centr	Murakami et al. 1998	
		<i>Atta colombica</i>	11	22	Centr e inters	Murakami et al. 1998	
		<i>Cyphomyrmex costatus</i>	-	20	Centr	Murakami et al. 1998	
		<i>Dinoponera lucida</i>	-	106	18 crom metacéntricos con het pericen y 2 con brazo corto heterocromático y bloque en extremo de brazo largo	-	
		Formicidae	<i>Gnamptogenys annulata</i>	-	68	3M, 23A, 8Am	Borges et al. 2004
			<i>Gnamptogenys</i> sp.	23	46	8M, 15A	Borges et al. 2004
		<i>Gnamptogenys striatula</i>	-	37	6 crom metacéntricos con het pericen, acrocéntricos con brazo corto heterocromático y pseudoacrocéntrico con brazo largo heterocromático	Borges et al. 2004	
		<i>Lasius niger</i>	15	-	Het paracentromérica en todos los crom	Palomeque et al. 1990	

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia
Vespoidea	Formicidae	<i>Myrmecia piliventris</i>	17	34	Crom acrocéntricos con brazo corto heterocromático, crom subtelocéntricos con bloques heterocromáticos	Imai et al. 1988
		<i>Myrmecia piliventris</i>	2	4	Het proximal en los 2 crom, pero crom 2 polimórfico para el patrón	Imai et al. 1988
		<i>Myrmecia pilosula</i>	1	2	Gran bloque heterocromático en el brazo corto, dividido en dos por eucromatina, bloque de la mitad del tamaño en el brazo largo	Imai et al. 1988
		<i>Sericomyrmex amabilis</i>	-	50	Het centromérica e intersticial	Murakami et al. 1998
		<i>Tapinoma erraticum</i>	8	-	Het paracentromérica en todos los crom	Palomeque et al. 1988
		<i>Tapinoma nigerrimum</i>	9	-	Het paracentromérica en todos los crom	Palomeque et al. 1988
		<i>Trachymyrmex</i> sp. 1	6	12	Het centromérica e intersticial	Murakami et al. 1998
		<i>Liostenogaster</i> sp.	7	14	7Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Metapolybia</i> sp.	19	-	Crom submetacéntrico mayor más fuertemente teñido	Pompolo & Takahashi 1990b
		<i>Polistes jadwigae</i>	31	-	23Am, 1Mc, 6M, 1Mcc	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Polistes mandarinus</i>	26	52	6Am, 13Amc, 6Mcc, 1Mcct	Hoshiba & Imai 1993
		<i>Polistes (Aphanilopterus) versicolor versicolor</i>	31	62	Bloques heterocromáticos en uno de los brazos de todos los crom	Pompolo & Takahashi 1990a
		<i>Polistes (Epicnemius) cinerascens</i>	27	54	Het pericen, a veces en uno de los brazos o a lo largo de todo el crom	Pompolo & Takahashi 1990a

Continuación Tabla 3.

Superfamilia	Familia	Género	n	2n	Distribución heterocromatina	Referencia
Vespoidea	Vespidae	<i>Polybia</i> sp. 1	16	-	3 submetacéntricos mayores con het en brazo largo, submetacéntricos menores con brazo corto heterocromático, 2 metacéntricos pequeños con un brazo heterocromático	Pompolo & Takahashi 1990b
		<i>Polybia</i> sp. 2	-	34	Algunos crom con regiones más fuertemente teñidas, centrómero poco teñido	Pompolo & Takahashi 1990b
		<i>Vespa crabro</i>	25	50	2Am, 4Amc, 14Ac, 1A, 1Mc, 2Mcc, 1Mcct	Hoshiba & Imai 1993

Tabla 4. Cantidad de machos (σ^7), hembras (♀) y proporción de machos por réplica por generación. En verde se resaltan las celdas para las que no se obtuvieron datos debido a que no fue posible formar parejas parentales (extinción de la línea), en rosa se resaltan las celdas donde no se pudo calcular la proporción de sexos debido a que no nacieron descendientes.

Tratamiento	Familia	Réplica	Generación 1			Generación 2			Generación 3			Generación 4		
			σ^7	♀	Prop.	σ^7	♀	Prop.	σ^7	♀	Prop.	σ^7	♀	Prop.
Endocría	1	A	20	18	0,53	23	11	0,68	9	5	0,64	18	2	0,90
		B	12	12	0,50	10	20	0,33	4	6	0,40	26	9	0,74
	2	A	26	11	0,70	21	8	0,72	11	11	0,50	38	13	0,75
		B	51	0	1,00									
	3	A	14	15	0,48	15	0	1,00						
		B	14	24	0,37	7	3	0,70	8	13	0,38	27	20	0,57
	4	A	19	32	0,37	24	0	1,00						
		B	0	5	0,00									
	5	A	11	9	0,55	24	6	0,80	10	5	0,67	0	0	-
		B	10	19	0,34	12	11	0,52	3	5	0,38	45	15	0,75
	6	A	16	20	0,44	30	10	0,75	5	12	0,29	25	13	0,66
		B	15	13	0,54	12	8	0,60	5	3	0,63	23	15	0,61
	7	A	6	9	0,40	15	22	0,41	3	10	0,23	33	17	0,66
		B	14	9	0,61	21	10	0,68	17	6	0,74	20	5	0,80
	8	A	12	25	0,32	15	23	0,39	2	1	0,67	16	8	0,67
		B	32	4	0,89	13	7	0,65	10	1	0,91	0	0	-
	9	A	27	10	0,73	12	12	0,50	8	1	0,89	23	19	0,55
		B	9	14	0,39	7	6	0,54	4	3	0,57	34	9	0,79
	10	A	16	17	0,48	18	7	0,72	9	8	0,53	14	13	0,52
		B	3	2	0,60	18	19	0,49	0	0	-			
	11	A	20	15	0,57	33	7	0,83	6	1	0,86	37	11	0,77
		B	14	24	0,37	8	4	0,67	14	0	1,00			
	12	A	9	3	0,75	15	8	0,65	8	5	0,62	25	5	0,83
		B	17	7	0,71	10	5	0,67	9	5	0,64	34	10	0,77
14	A	11	12	0,48	9	12	0,43	9	18	0,33	27	8	0,77	
	B	12	9	0,57	16	22	0,42	6	5	0,55	22	11	0,67	
15	A	27	15	0,64	0	0	-							
	B	9	5	0,64	0	0	-							
Exocría	1	-	14	12	0,54	15	14	0,52	4	7	0,36	16	24	0,40
	2	-	10	13	0,43	8	12	0,40	0	0	-	17	21	0,45
	3	-	13	28	0,32	13	15	0,46	0	0	-	39	0	1,00
	4	-	17	21	0,45	14	23	0,38	0	0	-	34	38	0,47
	5	-	14	14	0,50	12	7	0,63	0	0	-	19	16	0,54
	6	-	19	27	0,41	17	26	0,40	0	0	-	25	35	0,42
	7	-	10	7	0,59	18	33	0,35	4	2	0,67	47	0	1,00
	8	-	9	5	0,64	31	1	0,97	0	0	-	26	25	0,51
	9	-	14	23	0,38	12	12	0,50	0	0	-	27	31	0,47
	10	-	14	22	0,39	4	9	0,31	0	0	-	31	22	0,58

Tabla 5. Sexo y nivel de ploidía de los descendientes de cruzamientos madre por hijo.

Familia	Individuos sin sexar	Hembras	Machos		
			Haploides	Diploides	Ploidía desconocida
2	2	12	9 (+1?)	2	3
4	5	13	7 (+1?)	3 (+1?)	9
5	7	10	5(+1?)	0	7
6	4	6	6	0 (+1?)	2
8	3	3	5	0	0
11	10	5	5	0	3
12	5	7	2 (+1?)	0	3
13	5	9	5(+2?)	0 (+1?)	7
14	6	10	0 (+1?)	1 (+1?)	0
15	8	9	5 (+2?)	0 (+5?)	1
Totales	55	84	58	15	35

Tabla 6. Cantidad total de machos diploides y hembras observada en el ensayo, y cantidades esperadas bajo los modelos de determinación del sexo por alelos complementarios en un locus y en dos, tres y cuatro loci.

	Observado	Esperado			
		1 locus	2 loci	3 loci	4 loci
Machos	15	49	25	12	6
Hembras	84	50	74	87	93
Total	99	99	99	99	99
Frecuencia esperada de machos diploides		0,5	0,25	0,125	0,0625
Chi cuadrado		46,712	5,351	0,853	14,379

Tabla 7. Especies analizadas por FISH con ADNr. Sondas: (a) pAr.28S2 (28S de *Athalia rosae*) y pAr18S3 (18S de *A. rosae*); (b) Py12 en pBr322 (18S, 5.8S y 28S de *Drosophila melanogaster*); (c) pD103 en pM12 (de *D. melanogaster*); (d) pDm238 (18.2S y 5.8S de *D. melanogaster*); (e) 18S rDNA de *Zea mays*; (f) 45S rDNA de *Arabidopsis thaliana*; (g) pDm238 en pBr322; (h) pMc.rsSB0.5 (28S de *Myrmecia croslandi*); (i) pMc.r2 (28S de *M. croslandi*); y (j) pDm r.a 51#1 (18S y 28S de *D. melanogaster*).

Superfamilia	Familia	Especie	Número cromosómico	Cromosomas con señal de hibridación en el complemento diploide (sonda)	Referencias	
Tenthredinoidea	Tenthredinidae	<i>Athalia rosae</i>	2n=16/n=8	8 (a)	Matsumoto et al. 2002	
	Diprionidae	<i>Diprion pini</i>	2n=14/n=7	2 (b)	Roussellet et al. 1999	
		<i>Neodiprion abietis</i>	2n=16/n=8	2 (b)	Roussellet et al. 2000	
Ichneumonidea	Braconidae	<i>Cotesia congregata</i>	2n=20/n=10	2 (b)	Belle et al. 2002	
		<i>Apis mellifera</i>	2n=32/n=16	4 (c)	Beye & Moritz 1995	
	Apidae	<i>Melipona compressipes</i>	2n=18/n=9	2 (d)	Rocha et al. 2002	
		<i>Partamona helleri</i>	2n=34/n=17	6, 8 (e)	Brito et al. 2005	
		<i>Partamona seridoensis</i>	2n=34/n=17	7 (e)	Brito et al. 2005	
		<i>Trypoxylon (Trypargilium) albitarse</i>	2n=32/n=16	2 (d)	Araujo et al. 2002	
		<i>Anochetus altisquamis</i>	2n=30	2 (f)	Santos et al. 2010	
		<i>Anochetus horridus</i>	2n=46	2 (f)	Santos et al. 2010	
	Vespoidea	Formicidae	<i>Dinoponera lucida</i>	n=59	2 (g)	Mariano et al. 2008
			<i>Myrmecia arnoldi</i>	2n=53, 55, 57, 59, 60, 64, 66	14, 15, 19 (h)	Hirai et al. 1996
Formicidae		<i>Myrmecia banksi</i>	2n=10	2 (i)	Hirai et al. 1994	
		<i>Myrmecia banksi</i>	2n=10	2 (h)	Hirai et al. 1996	
		<i>Myrmecia chasei</i>	2n=47	8 (h)	Hirai et al. 1996	
		<i>Myrmecia croslandi</i>	2n=3	2 (j)	Imai et al. 1992	
		<i>Myrmecia croslandi</i>	2n=3	2 (i)	Hirai et al. 1994	
		<i>Myrmecia croslandi</i>	2n=3, 4	2, 3 (h)	Hirai et al. 1996	
		<i>Myrmecia forcifata</i>	2n=52, 54	7, 11 (h)	Hirai et al. 1996	

ANEXO SOLUCIONES

Anexo soluciones

- **0,1x SSC, 2x SSC, 4x SSC**

1. Diluir a concentración deseada la solución stock de 20x SSC.

- **20x SSC**

NaCl (3 M)..... 175,32 gr
 Citrato sódico (0,3 M) 88,23 gr

1. Disolver los sólidos en 800 ml de agua miliQ.
2. Llevar a volumen de 1000 ml.

- **Buffer McIlvaine pH7**

Solución A

Ácido cítrico monohidratado

(0,1 M)..... 2,101 gr

1. Disolver el ácido cítrico en 100 ml de agua bidestilada.
2. Conservar a 4 °C.

Solución B

Na₂HPO₄·2H₂O 35,6 gr

1. Disolver el Na₂HPO₄·2H₂O en 1000 ml de agua bidestilada.
2. Conservar a 4 °C.

Armado del Buffer

1. Mezclar 8,8 ml de Solución A y 41,2 ml de Solución B.

- **Buffer PBS (Fosfato) 1x**

NaCl..... 8 gr
 KCl 0,2 gr
 Na₂HPO₄ 1,44 gr
 KH₂PO₄..... 0,24 gr

1. Disolver los sólidos en 800 ml de agua bidestilada estéril.
2. Llevar a pH 7,4.
3. Llevar a volumen final de 1000 ml con agua bidestilada estéril.

- **Buffer TBE (Tris Borato) 5x**

Tris base 54 gr
 Ácido bórico..... 27,5 gr
 EDTA (0,5 M) (pH 8) 20 ml

1. Disolver las drogas en agua bidestilada llevando a un volumen final de 1000 ml.

- **CMA₃**

CMA₃ 10 mg
 Buffer McIlvaine 5 ml
 Cl₂Mg.6H₂O 1 M..... 0,05 ml
 Agua bidestilada estéril..... 5 ml

1. Disolver las drogas, fraccionar y guardar en microtubos tapados con papel de aluminio.

- **EDTA (Etilen-diamino-tetraacetato de disodio) 0,5 M pH8**

EDTA..... 186,1 g

1. Disolver el EDTA en 800 ml de agua bidestilada.
2. Agitar vigorosamente en un agitador magnético.
3. Ajustar el pH con NaOH.
4. Llevar a volumen final de 1000 ml.

- **Hematoxilina férrica acética**

Hematoxilina1 gr
 Alumbre de hierro (FeNH₄(SO₄)₂.12H₂O).....0,25 gr
 Ácido acético 45/ 100 ml

1. Mezclar todos los componentes en un frasco de vidrio color caramelo.
2. Dejar madurar una semana.
3. Filtrar y almacenar en oscuridad.

- **Solución Denhart 50x**

Ficoll 2,5 g
 Polivinilpirrolidon..... 2,5 gr
 BSA..... 2,5 gr

1. Disolver las drogas en 250 ml de agua destilada.
2. Filtrar con un filtro de 0,45 µm.
3. Alicuotar y conservar a -20 °C.

- **Solución fisiológica**

NaHCO₃ (0,02 /)..... 0,2 gr
 NaCl (0,9 /) 9 gr
 KCl (0,042 /)..... 0,42 gr
 CaCl₂.2H₂O (0,025 /)..... 0,33 gr

1. Disolver NaHCO₃ 100 ml de agua bidestilada estéril.
2. Disolver NaCl, KCl y CaCl₂.2H₂O en 800 ml de agua bidestilada estéril.
3. Mezclar las dos soluciones en un matraz de 1000 ml y llevar a volumen.
4. Conservar a 4 °C.



- **Solución hipotónica**

KCl (0,075 M) 0,5592 gr

1. Disolver KCl en 100 ml de agua bidestilada.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Abe Y. 1994. The karyotype of the chestnut gall wasps *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera, Cynipidae). *Applied Entomology and Zoology* 29: 299-300.
- Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, Burquez A, Buchmann SL, Cane JH, Cox PA, Dalton V, Feinsinger P, Ingram M, Inouye D, Jones CE, Kennedy K, Kevan P, Koopowitz H, Medellín R, Medellín-Morales S, Nabhan GP, Pavlik B, Tepedino V, Torchio P, Walter S. 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology* 12: 8–17.
- Antolin MF. 1999. A genetic perspective on mating systems and sex ratios of parasitoid wasps. *Researches on Population Ecology* 41: 29–37.
- Appels R, Gerlachi W, Dennis L, Swift S, Peacock WJ. 1980. Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals. *Chromosoma* 78: 293-311.
- Araujo SMSR, Silva CC, Pompolo SG, Perfectti F, Camacho JPM. 2002. Genetic load caused by variation in the amount of rDNA in a wasp. *Chromosome Research* 10: 607-613.
- Ayala FJ, Kiger JA. 1984. *Modern genetics*. Benjamin/Cummings. Menlo Park, California.
- Babu KA, Verma RS. 1987. Chromosome structure: Euchromatin and heterochromatin. *International Review of Cytology* 108: 1-60.
- Baldanza F, Gaudio L, Viggiani G. 1999. Cytotaxonomic studies of *Encarsia* Foerster (Hymenoptera: Aphelinidae). *Bulletin of Entomological Research* 89(3): 209–215.
- Baldanza F, Odierna G, Viggiani G. 1991. A new method for studying chromosomes of parasitic Hymenoptera, used on *Encarsia berlesei* (Howard) (Hymenoptera: Aphelinidae). *Bolletino del Laboratorio di Entomologia Agraria "Filippo Silvestri"* (Portici) 48: 29-34.
- Baranowsky RM, Glenn H, Sivinski J. 1993. Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 76: 245-251.
- Baruffi L, Damian G, Guglielmino CR, Bandi C, Malacrida AR, Gasperi G. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data. *Heredity* 74: 425–437.
- Bell G. 1982. *The masterpiece of nature: The evolution of genetics and sexuality*. University of California Press. Berkeley, California.
- Belle E, Beckage NE, Rousselet J, Poirié M, Lemeunier F, Drezen JM. 2002. Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome. *Journal of Virology* 76(11): 5793-5796.
- Bernstein E, Allis CD. 2005. RNA meets chromatin. *Genes and Development* 19: 1635-1655.
- Bess HA, van den Bosch R, Haramoto F. 1961. Fruit fly and their activities in Hawaii. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 17(3): 376-378.

-
- Beukeboom LW, Ellers J, van Alphen JJM. 2000. Absence of single-locus complementary sex determination in the braconid wasps *Asobara tabida* and *Alysia manducator*. *Heredity* 84: 29-36.
- Beukeboom LW, Kamping A, van de Zande L. 2007. Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): A critical consideration of models and evidence. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18: 371–378.
- Beukeboom LW. 1995. Sex determination in Hymenoptera: a need for genetic and molecular studies. *BioEssays* 17(9): 813-817.
- Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page Jr. RE, Omholt SW. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 144: 419-429.
- Beye M, Moritz RFA. 1995. Characterization of honeybee (*Apis mellifera* L.) chromosomes using repetitive DNA probes and fluorescence *in situ* hybridization. *The Journal of Heredity* 86(2): 145-150.
- Beye M. 2004. The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BioEssays* 26: 1131–1139.
- Blackburn EH. 1991. Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569-573.
- Boivin G, Jacob S, Damiens D. 2005. Spermatogeny as a life-history index in parasitoid wasps. *Oecologia* 143: 198–202.
- Borges DS, Mariano CSF, Delabie JHC, Pompolo CG. 2004. Estudos citogenéticos em formigas neotropicais do gênero *Gnamptogenys* Roger (Hymenoptera, Formicidae, Ectatomminae). *Revista Brasileira de Entomologia* 48(4): 481-484.
- Bressa MJ, Papeschi AG, Vítková M, Kubíčková S, Fuková I, Pigozzi MI, Marec F. 2009. Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus *Dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenetics and Genome Research* 125: 292-305.
- Brito RM, Caixeiro APA, Pompolo SG, Garcia Azevedo G. 2003. Cytogenetic data of *Partamona peckolti* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining with DA/CMA₃ and DA/DAPI. *Genetics and Molecular Biology* 26(1): 53-57.
- Brito RM, Pompolo SG, Martins Magalhaes MF, Gonçalves de Barros E, Sakamoto-Hojo ET. 2005. Cytogenetic characterization of two *Partamona* species (Hymenoptera, Apinae, Meliponini) by fluorochrome staining and localization of 18S rDNA clusters by FISH. *Citología* 70(4): 373-380.
- Brito RM. 1998. Caracterização citogenética de duas espécies do gênero *Partamona*, Schwarz 1939 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). MS Dissertation. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

-
- Brito-Ribon RM, Miyazawa CS, Pompolo SG. 1999. First karyotype characterization of four species of *Partamona* (Friese, 1980) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) in Mato Grosso State - Brazil. *Cytobios* 100: 19-26.
- Britten RJ, Kohne DE. 1969. Handbook of Molecular Cytology. North-Holland Publication. Amsterdam.
- Bruckner D. 1978. Why are there inbreeding effects in haplodiploid systems? *Evolution* 32: 456–458.
- Bruvo B, Plohl M, Ugarkovic D. 1995. Uniform distribution of satellite DNA variants on the chromosomes of tenebrionid species *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*. *Hereditas* 123: 69–75.
- Bull JJ. 1983. Evolution of sex determining mechanisms. Benjamin/Cummings. Menlo Park, California.
- Camacho JPM, Cabrero J, Viseras E, Lopez-Leon MD, Navas-Castillo J, Alche JP. 1991. G banding in two species of grasshoppers and its relationships to C, N and fluorescence banding techniques. *Genome* 34: 638-643.
- Cancino Diaz JL, Enkerlin JW. 1992. Utilización del control biológico en la campaña nacional contra moscas de la fruta. XXIV Congreso Nacional de Control Biológico, Cuautitlán Izcalli, México.
- Cancino JL, López E, Aguilar CE. 1995. Liberaciones inundativas de parasitoides como método alternativo de control de *Ceratitidis capitata* en fincas cafetaleras en el Soconusco, Chiapas, Mexico. Primera Conferencia Internacional IFOAM sobre café orgánico, IFOAM/AMAE/ Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Cancino JL. 1998. Procedimientos y fundamentos de la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) parasitoides de moscas de la fruta. XII Curso Internacional sobre Moscas de la Fruta, Metapa de Domínguez, Chiapas, México.
- Carabajal Paladino LZ, Cladera JL, Papeschi AG. 2004. Una técnica para observar los cromosomas de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). XXXIII Congreso Argentino de Genética, Malargüe, Mendoza.
- Carabajal Paladino LZ, Horny C, Cladera JL. 2003. La determinación del sexo en himenópteros y la posibilidad de su manipulación en parasitoides. XXXII Congreso Argentino de Genética, Huerta Grande, Córdoba.
- Carabajal Paladino LZ, Papeschi AG, Cladera JL. 2010. Immature stages of development in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. *Journal of Insect Science* 10:56.
- Carabajal Paladino LZ. 2005. Caracterización citogenética del parasitoides *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Ichneumonoidea, Braconidae). Tesis de Licenciatura. Universidad de Morón.

-
- Carro X, Hernández J, Zuñiga E, Cancino JL. 2001. Perspectives of the biological control of fruit flies in Costa Rica. 4th WGFFWH Meeting, Mendoza, Argentina.
- Carvalho RS, Nascimento AS. 2002. Cría y utilización de *Diachasmimorpha longicaudata* para control biológico de moscas de la fruta (Tephritida). En: Controle Biológico no Brasil. Parasitóides e Depredadores. Parra JR, Botelho PSM, Correa-Ferreira BS, Bento JMS (eds.). Manole Ltd., Barueri. Pp. 165-179.
- Cerbah M, Coulaud J, Godelle B, Siljak-Yakoviev S. 1995. Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome* 38: 689-695.
- Cerbah M. 1997. Hétérochromatine, organisateurs nucléolaires et evolution du genome chez quelques espèces végétales: cas particulier du genre *Hypochoeris*. Tesis Doctoral. Universidad de Orsay.
- Chaplin JA, Havel JE, Hebert PDN. 1994. Sex and ostracods. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 435-439.
- Charnov EL. 1982. The theory of sex allocation. Princeton University Press; New Jersey.
- Clark AM, Bertrand HA, Smith RE. 1963. Life span differences between haploid and diploid males of *Habrobracon serinopae* after exposure as adults to X rays. *The American Naturalist* 97: 203-208.
- Clausen CP, Clancy DW, Chock QC. 1965. Biological control of the oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. *Technical Bulletin of the United States Department of Agriculture* 322: 67-102.
- Colomba M, Vitturi R, Volpe N, Lannino A, Zunino M. 2004. Karyotype, banding and rDNA FISH in the scarab beetle *Anoplotrupes stercorosus* (Coleoptera Scarabaeoidea: Geotrupidae): Description and comparative analysis. *Micron* 35: 717-720.
- Cook JM, Crozier RH. 1995. Sex determination and population biology in the Hymenoptera. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 281-286.
- Cook JM. 1993. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* 71: 421-35.
- Costa KF, Brito RM, Miyazawa CS. 2004. Karyotypic description of four species of *Trigona* (Jurine, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) from the State of Mato Grosso, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 27(2): 187-190.
- Costa MA, Melo GA, Pompolo SG, Campos LAO. 1993. Karyotypes and heterochromatin distribution (C-band patterns) in three species of *Microstigmus* wasps (Hymenoptera, Sphecidae, Pemphredoninae). *Revista Brasileira de Genética* 16(4): 923-926.
- Crozier RH. 1971. Heterozygosity and sex determination in haplodiploidy. *American Naturalist* 105: 399-412.

-
- Crozier RH. 1975. Hymenoptera. *En*: Animal cytogenetics. John B (ed.). Borntreager. Berlin, Germany. Vol 3 Insecta 7.
- Crozier RH. 1977. Evolutionary genetics of the Hymenoptera. *Annual Reviews of Entomology* 22: 263–288.
- Crozier RH. 1985. Adaptive consequences of male haploidy. *En*: Spider mites: Their biology, natural enemies, and control Vol 1. Helle W, Sabelis MW (eds.). Elsevier. Amsterdam. Pp. 201–222.
- Cunha AB, Kerr WE. 1957. A genetical theory to explain sex determination by arrhenotokous parthenogenesis. *Forma et Functio* 4: 33-36.
- da Cruz-Landim C. 2001. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. *Iheringia. Série Zoologia* 91: 183-189.
- de Boer JG, Ode PJ, Rendahl AK, Vet LEM, Whitfield JB, Heimpel GE. 2008. Experimental support for multiple locus complementary sex determination in the parasitoid *Cotesia vestalis*. *Genetics* 180: 1525-1535.
- Debach P, Rosen D. 1991. Biological control by natural enemies. Cambridge University Press. Cambridge.
- DeBach P. 1964. Biological control of insect pests and weeds. Reinhold. New York.
- Delfín GH, Burgos RD. 2000. Los braconídeos (Hymenoptera: Braconidae) como grupo parámetro de biodiversidad en las servas deciduas del trópido: una discusión acerca de su posible uso. *Acta Zoológica Mexicana (ns)* 79: 43-56.
- Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Bonillo C, Volobouev V. 2002. “Ag-NORs” are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogenetics and Genome Research* 98: 75-77.
- Dobson SL, Tanouye MA. 1998. Interspecific movement of the paternal sex ratio chromosome. *Heredity* 81: 261-269.
- Domingues AMT, Waldschmidt AM, Andrade SE, Souza VA, Alves RMO, Silva Junior JC, Costa MA. 2005. Karyotype characterization of *Trigona fulviventris* Guérin, 1835 (Hymenoptera, Meliponini) by C banding and fluorochrome staining: Report of a new chromosome number in the genus. *Genetics and Molecular Biology* 28(3): 390-393.
- Dowton M, Belshaw R, Austin AD, Quicke DLJ. 2002. Simultaneous molecular and morphological analysis of braconid relationships (Insecta: Hymenoptera: Braconidae) indicates independent mt-tRNA gene inversions within a single wasp family. *Journal of Molecular Evolution* 54: 210-226.
- Dreyfus A, Breuer ME. 1944. Chromosomes and sex determination in the parasitic hymenopteron *Telenomus fariai* (Lima). *Genetics* 29: 75-82.
- Drouin G, de Sa MM. 1995. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Molecular Biology and Evolution* 12: 481–493.

-
- Emelyanov AF, Kirillova VI. 1989. Forms and directions of karyotype evolution in Cicadina (Homoptera). I. Specific features and evolutionary changes of karyotypes in the superfamily Cicadelloidea. *Entomol. Obozr.* 68: 587-603 (en ruso).
- Eskafi FM. 1990. Parasitism of fruit flies *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp (Diptera: Tephritidae) en Guatemala. *Entomophaga* 35(3): 355-362.
- Favila ME, Halfpeter G. 1997. The use of indicator groups for measuring biodiversity as related to community structure and function. *Acta Zoológica Mexicana (ns)* 72: 1-25.
- Fernández F. 2006. Sistemática de los himenópteros de la Región Neotropical: Estado del conocimiento y perspectivas. *En: Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical.* Fernández F, Sharkey MJ (eds.). Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia. Bogotá DC. Pp 7-35.
- Frolich MW. 1987. Common-is-primitive: a partial validation by tree counting. *Systematic Botany* 12: 217-237.
- Fuková I, Nguyen P, Marec F. 2005. Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* 48: 1083-1092.
- Glaser RW. 1917. The Growth of Insect Blood Cells in Vitro. *Psyche* 24: 1-6.
- Godfray HCJ. 1994. *Parasitoids: Behavioural and Evolutionary Ecology.* Princeton University Press. New Jersey.
- Goessens G. 1984. Nucleolar structure. *International Review of Cytology* 84: 107-158.
- Gokhman VE, Fedina TY, Timokhov AV. 1999. Life-history strategies in parasitic wasps of the *Anisopteromalus calandrae* complex (Hymenoptera: Pteromalidae). *Russian Entomological Journal* 8: 201-211.
- Gokhman VE, Kuznetsova VG. 2006. Comparative insect karyology: Current state and applications. *Entomological Review* 86(3): 352-368.
- Gokhman VE, Quicke DLJ. 1995. The last twenty years of parasitic Hymenoptera karyology: an update and phylogenetic implications. *Journal of Hymenoptera Research* 4: 41-63.
- Gokhman VE, Westendorff M. 2000. The chromosomes of three species of the *Nasonia* complex (Hymenoptera, Pteromalidae). *Beiträge zur Entomologie* 50(1): 193-198.
- Gokhman VE, Westendorff M. 2003. Chromosomes of *Aphidius ervi* Haliday, 1834 (Hymenoptera, Braconidae). *Beiträge zur Entomologie* 53: 161-165.
- Gokhman VE. 1990. Karyology and systematic of parasitic wasps of the subfamily Ichneumoninae (Hymenoptera, Ichneumonidae). PhD dissertation in biology. Moscow State University, Moscow.

-
- Gokhman VE. 1997a. Chromosome number and other karyotypic features of parasitic wasps as a source of taxonomic information. *Boletín de la Asociación Española de Entomología (Supl.)*: 53-60.
- Gokhman VE. 1997b. Differential Staining of Chromosomes of Ichneumons from the Genus *Dirophanes* (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Zoolicheskii Zhurnal* 76(1): 65–68.
- Gokhman VE. 2000. Karyology of the parasitic Hymenoptera: current state and perspectives. *En: Hymenoptera: Evolution, biodiversity and biological control*. Austin AD, Downton M (eds). Collingwood. Pp 198-206.
- Gokhman VE. 2001a. Chromosomes of ichneumons from the family Ichneumonidae (Hymenoptera). *Zoolicheskii Zhurnal* 80(8): 968–975.
- Gokhman VE. 2001b. Chromosomes of parasitic wasps of the subfamily Anteoninae (Hymenoptera, Dryinidae). *Entomological Reviews* 81: 1266-1268.
- Gokhman VE. 2002a. Chromosomal analysis of the superfamilies Ichneumonoidea and Chalcidoidea (Hymenoptera). *En: Parasitic wasps: evolution, systematic, biodiversity and biological control*. Melika G, Thuróczy C (eds.). Agroinf. Budapest.
- Gokhman VE. 2002b. Chromosomes of ichneumons from the family Eulophidae (Hymenoptera). *Zoolicheskii Zhurnal* 81(3): 323–328.
- Gokhman VE. 2002c. Chromosomes of Chrysidoidea (Hymenoptera). *En: Parasitic wasps: evolution, systematic, biodiversity and biological control*. Melika G, Thuróczy C (eds.). Agroinform. Budapest.
- Gokhman VE. 2002d. Karyotype evolution and the role of chromosome analysis in the taxonomy of parasitic Hymenoptera. XII S" ezd. Russkogo entomologicheskogo obshchestva, Tezisy dokladov (Proc. XII Congress of Russian Entomological Society). St. Petersburg p87.
- Gokhman VE. 2003. Karyotypes of parasitic Hymenoptera: Evolution and the role in systematics and phylogeny. Tesis Doctoral. Moscow State University.
- Gokhman VE. 2004. Karyotype evolution in parasitic hymenoptera. *Entomological Review* 84(2): S161-S169. (Traducido de: *Zoologicheskii Zhurnal* 83(8)).
- Gokhman VE. 2005. New chromosome records for the superfamily Chalcidoidea (Hymenoptera). *Cytologia* 70: 239-241.
- Gokhman VE. 2006. Karyotype of parasitic Hymenoptera: Diversity, evolution and taxonomic significance. *Insect Science* 13: 237-241.
- Gokhman VE. 2007a. Karyotypes of Hymenoptera: diversity, evolution and taxonomic significance // *Studies on hymenopterous insects*. KMK Scientific Press Ltd. Moscow. Pp. 10-27.

-
- Gokhman VE. 2007b. Karyosystematics of parasitic Hymenoptera: taxonomic decisions at the species level. *Comparative Cytogenetics* 1(1): 85-88.
- Gokhman VE. 2009. *Karyotypes of the parasitic Hymenoptera*. Springer.
- Gomes LF, Brito RM, Pompolo SG, Campos LAO, Peruquetti RC. 1998. Karyotype and C- and G-banding patterns of *Eufriesea violacea* (Hymenoptera, Apidae, Euglossinae). *Hereditas* 128: 73–76.
- Gomes LF, Pompolo SG, Campos LAO. 1995. Cytogenetic analysis of three species of *Trypoxylon* (*Trypoxylon*) (Hymenoptera, Sphecidae, Larrinae). *Revista Brasileira de Genética* 18(2): 173-176.
- Goodpasture C, Bloom SE. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53: 37-50.
- Goodpasture C, Grissell EE. 1975. A karyological study of nine species of *Torymus* (Hymenoptera: Torymidae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 17: 413-422.
- Goodpasture C. 1974. *Cytological data and classification of the Hymenoptera*. Tesis doctoral. University of California, Davis.
- Goodpasture C. 1975. Comparative courtship behavior and karyology in *Monodentomerus* (Hymenoptera: Torymidae). *Annals of the Entomological Society of America* 68: 391-397.
- Gosden J, Lawrie S, Seuanez H. 1978. Ribosomal and human-homologous repeated DNA distribution in the orangutan (*Pongo pygmaeus*). Comparison with the distribution of these DNAs in the other species of the Hominidae. *Cytogenetics and Cell Genetics* 21: 1-10.
- Gottlieb S, Esposito RE. 1989. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* 56: 771–776.
- Goulet H, Huber JT. 1993. *Hymenoptera of the world: An identification guide to families*. Agriculture Canada. Ottawa.
- Greany PD, Ashley TR, Baranowski RM, Chambers DL. 1976. Rearing and life history studies on *Biosteres (Opus) longicaudatus* [Hym.: Braconidae]. *Entomophaga* 21: 207-215.
- Greany PD, Tumlinson JH, Chambers DL, Bousch GM. 1977. Chemically mediated host finding by *Biosteres (Opus) longicaudatus*, a parasitoid of Tephritid fruit fly larvae. *Journal of Chemical Ecology* 3: 189-195.
- Greider CW, Autexier C, Avilion AA, Collins K, Harrington LA, Mantell LL, Prowse KR, Smith SK, Allsopp RC, Counter CM, Vaziri H, Bacchetti S, Harley CB. 1993. Telomeres and telomerase: biochemistry and regulation in senescence and immortalization. *En: The chromosome*. Heslop-Harrison JS, Flavell RB (eds). Bios Scientific Publisher. Oxford. Pp 115-125.

-
- Grigoryev AS, Bulynko YA, Popova EY. 2006. The end adjusts the means: Heterochromatin remodelling during terminal cell differentiation. *Chromosome Research* 14: 53–69.
- Gu H, Dorn S. 2003. Mating system and sex allocation in the gregarious parasitoid *Cotesia glomerata*. *Animal Behavior* 66: 259-264.
- Hadjiolov AA. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. Springer.
- Hagemann S, Scheer B, Schweizer D. 1993. Repetitive sequences in the genome of *Anemone blanda*: Identification of tandem arrays and of dispersed repeats. *Chromosoma* 102: 312-324.
- Hagen B. 1953. A pre-mating period in certain species of the genus *Opius* (Hymenoptera: Braconidae)". *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 15(12): 115-116.
- Haig D. 1998. Mother's boy or daddy's girl? Sex determination in Hymenoptera. *Trends in Ecology and Evolution* 13(10): 380-381.
- Hake L, O'Connor C. 2008. Genetic mechanisms of sex determination. *Nature Education*.
- Hall KJ, Parker JS. 1995. Stable chromosome fission associated with rDNA mobility. *Chromosome Research* 3: 417-422.
- Hamilton WD. 1975. Gamblers since life began: barnacles, aphids, elms. *Quarterly Review of Biology* 50: 175-180.
- Hankeln T, Schmidt ER. 1993. Divergent evolution of an 'Orphon' histone gene cluster in *Chironomus*. *Journal of Molecular Biology* 234: 1301–1307.
- Hanson P, Gauld ID. 1995. The Hymenoptera of Costa Rica. Oxford University Press. Oxford.
- Hanson P. 1990. La sistemática aplicada al estudio de la biología de los parasitoides. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 15: 53-66.
- Hasselmann M, Gempe T, Schiøtt M, Nunes-Silva CG, Otte M, Beye M. 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454: 519-523.
- Hawkins BA, Lawton JH. 1987. Species richness for parasitoids of British polyphagous insects. *Nature* 326: 788-790.
- Hedrick PW, Parker JD. 1997. Evolutionary genetics of haplo-diploid organisms and X-linked chromosomes. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 55–83.
- Heimpel GE, de Boer JG. 2008. Sex Determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 53: 209–30.
- Hennig W. 1999. Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9.
- Hernández-Verdún D. 1986. Structural organization of the nucleolus in mammalian cells. *Methods and Achievements in Experimental Pathology* 12: 26-62.

-
- Herrick G, Seger J. 1999. Imprinting and paternal genome elimination in insects. *En: Genomic imprinting: and interdisciplinary approach*. Ohlsson R (ed.). Springer. Berlín. Pp. 41-71.
- Hirai H, Yamamoto M-T, Ogura K, Satta Y, Yamada M, Taylor RW, Imai HT. 1994. Multiplication of 28S rDNA and NOR activity in chromosome evolution among ants of the *Myrmecia pilosula* species complex. *Chromosoma* 103: 171-178.
- Hirai H, Yamamoto M-T, Taylor RW, Imai HT. 1996. Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosome* 105: 190-196.
- Hoshiya H, Imai HT. 1993. Chromosome evolution of bees and wasps (Hymenoptera, Apocrita) on the basis of C-banding pattern analyses. *Japanese Journal of Entomology* 61: 465-492.
- Howard RS, Lively CM. 1994. Parasitism, mutation accumulation and the maintenance of sex. *Nature* 367: 554-557.
- Howell WM, Black DA. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hubbel HR. 1985. Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology* 60: 285.
- Huisinga KL, Brower-Toland B, Elgin SC. 2006. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma* 115(2): 110-122.
- Hung ACF. 1986. Chromosomes of three *Brachymeria* species (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Experientia* 42: 579-580.
- Imai HT, Crozier RH, Taylor RW. 1977. Karyotype evolution in Australian ants. *Chromosoma (Berl)* 59: 341-393.
- Imai HT, Hirai H, Satta Y, Shiroishi T, Yamada M, Taylor RW. 1992. Phase specific Ag-staining of nucleolar organizer regions (NORs) and kinetochores in the Australian ant *Myrmecia croslandi*. *Japanese Journal of Genetics* 67: 437-447.
- Imai HT, Maruyama T, Gojobori T, Inoue Y, Crozier RH. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. I. The minimum interaction hypothesis. *The American Naturalist* 128: 900-920.
- Imai HT, Taylor RW, Crosland MWJ, Crozier RH. 1988. Modes of spontaneous chromosomal mutation and karyotype evolution in ants with reference to the minimum interaction hypothesis. *Japanese Journal of Genetics* 63: 159-185.
- Imai HT, Taylor RW, Crozier RH. 1994. Experimental bases for the minimum interaction theory. I. Chromosome evolution in ants of the *Myrmecia pilosula* species complex (Hymenoptera: Formicidae: Myrmeciinae). *Japanese Journal of Genetics* 69: 137-182.

-
- Imai HT. 1991. Mutability of constitutive heterochromatin (C-bands) during eukaryotic chromosomal evolution and their cytological meaning. *Japanese Journal of Genetics* 66: 635-661.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
- Jirón LF, Mesón RG. 1989. Parasitoid hymenopterans of Costa Rica: geographical distribution of the species associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Entomophaga* 34(1): 53-60.
- Juan C, Petitpierre E. 1989. C-banding and DNA content in seven species of *Tenebrionidae* (Coleoptera). *Genome* 32: 834-839.
- Judson OP, Normark BB. 1996. Ancient asexual scandals. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 41-46.
- Kevan PG, Viana BF. 2003. The global decline of pollination services. *Biodiversity* 4: 3-8.
- Kidwell MG. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.
- King M, Contreras N, Honeycutt RL. 1990. Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S *in situ* hybridization. *Genetica* 80: 17-29
- King M. 1980. C-banding studies on Australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma* 80(2): 191-217.
- Kitthawee S, Singhapong S, Baimai V. 1999. Metaphase chromosomes of parasitic wasp, *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Thailand. *Cytologia* 64: 111-115.
- Kitthawee S, Singhapong S, Baimai V. 2004. Karyotypes of five species of tephritid fruit fly parasitoid (Hymenoptera: Braconidae) from Thailand. *Caryologia* 57(2): 133-137.
- Knibiehler B, Mirre C, Rosset R. 1982. Nucleolar organizer structure and activity in a nucleolus in an established *Drosophila* cell line. *Journal of Cell Science* 57: 351-364.
- Krieger MJB, Ross KG, Chang CWY, Keller L. 1999. Frequency and origin of triploidy in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Heredity* 82: 142-150.
- Lacadena JR. 1988. *Genética*. 4ª Edición. AGESA, Madrid.
- Lasalle J, Gauld ID. 1991. Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. *Redia* 74 (3): 315-334.
- Lasalle J, Gauld ID. 1993. *Hymenoptera and Biodiversity*. C.A.B. International. Oxon.
- Lawrence PO, Baranowsky RM, Greany PD. 1976. Effect of host age on development of *Biosteres (Opus) longicaudatus*, a parasitoid of the Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*. *The Florida Entomologist* 59(1): 33-39.

-
- Lawrence PO. 1981. Host vibration: a cue to host location by the parasite *Biosteres longicaudatus*. *Oecología* 48: 249-251.
- Lawrence PO. 1982. *Biosteres longicaudatus*: development dependence on host (*Anastrepha suspensa*). *Physiology experimental parasitology* 53: 396-405.
- Leather SR, Hardie J. 1995. *Insect reproduction*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS. 1992. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* 35: 1013-1018.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1965. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Leyva V, Martínez L, Valdez J. 1988. Mecanismos de detección del huésped utilizados por *Diachasmimorpha (Biosteres) longicaudatus* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) y estructura de los órganos de recepción. *Folia Entomológica Mexicana* 76: 165-176.
- Liebert AE, Johnson RN, Switz GT, Starks PT. 2004. Triploid females and diploid males: underreported phenomena in *Polistes* wasps? *Insectes Sociaux* 51: 205-211.
- Long EO, Dawid IB. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* 49: 727-764.
- Lopes DM, Pompolo SG, Campos LAO, Tavares MG. 2008. Cytogenetic characterization of *Melipona rufiventris* Lepeletier 1836 and *Melipona mondury* Smith 1863 (Hymenoptera, Apidae) by C banding and fluorochromes staining. *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 49-52.
- Lorite P, Aránega AE, Luque F, Palomeque T. 1997. Analysis of the nucleolar organizing regions in the ant *Tapinoma nigerrimum* (Hymenoptera, Formicidae). *Heredity* 78: 578-582.
- Luck RF, Stouthamer R, Nunney L. 1992. Sex determination and sex ratio patterns in parasitic Hymenoptera. *En: Evolution and diversity of sex ratio in insects and mites*. Wrench DL, Ebbert MA (eds.). Chapman and Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Luger K, Hansen JC. 2005. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 188-196.
- Luna MG, Hawkins BA. 2004. Effects of inbreeding versus outbreeding in *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environmental Entomology* 33: 765-775.
- Lund AH, van Lohuizen M. 2004. Epigenetics and cancer. *Genes and Development* 18: 2315-2335.
- Macgregor H, Varley J. 1988. *Working with Animal Chromosomes*. John Wiley & Sons.
- Maffei EMD, Pompolo SG, Campos LAO, Petitpierre E. 2001. Sequential FISH analysis with rDNA genes and Ag-NOR banding in the lady beetle *Olla vni-grum* (Coleoptera: Coccinellidae). *Hereditas* 135: 13-18.

-
- Mahowald, M. y von Wettberg, E. 1999. <http://www.sccs.swarthmore.edu/users/99/mahowald/hymenoptera.html>.
- Mariano CSF, Pompolo SG, Barros LAC, Mariano-Neto E, Campiolo S, Delabie JHC. 2008. A biogeographical study of the threatened ant *Dinoponera lucida* Emery (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae) using a cytogenetic approach. *Insect Conservation and Diversity* 1: 161–168.
- Martínez JJ. 2009. Diversidad de Doryctinae (Insecta: Hymenoptera: Braconidae) de la Argentina, con énfasis en las formas gallícolas. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Martínez L. 1989. Factores de importancia para la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). XXV Congreso Nacional de Entomología, Oaxaca, México.
- Martínez L. 1992. Parasitismo, supervivencia y reproducción de *Diachasmimorpha longicaudata* parasitoide de moscas de la fruta. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.
- Marucci PE, Clancy DW. 1950. The artificial culture of fruit flies and their parasites. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 14(1): 163-166.
- Matsumoto K, Yamamoto DS, Sumitani M, Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K. 2002. Detection of a single copy gene on a mitotic metaphase chromosome by fluorescence in situ hybridization (FISH) in the sawfly *Athalia rosae* (Hymenoptera). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 49(1): 34-40.
- McClung CE. 1902. The accessory chromosome sex determinant? *The Biological Bulletin* 3: 43-84.
- Miller DA, Dev VG, Tantravahi R, Miller OJ. 1976. Suppression of human nucleolus organizer in mouse-human somatic hybrid cells. *Experimental Cell Research* 101: 235-243.
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Barrera J, Cancino JL, Aluja M. 2000. Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93(1): 47-54.
- Moreira PA, Araújo VA, Zama U, Lino-Neto J. 2008. Morphology of male reproductive system in three species of *Trypoxylon* (*Trypargilum*) Richards (Hymenoptera: Crabronidae). *Neotropical Entomology* 37(4): 429-435.
- Murakami T, Fujiwara A, Yoshida MC. 1998. Cytogenetics of ten ant species of the tribe Attini (Hymenoptera, Formicidae) in Barro Colorado Island, Panama. *Chromosome Science* 2: 135-139.
- Murray BG, Bennett MD, Hammett KRW. 1992. Secondary constrictions and NORs of *Lathyrus* investigated by silver staining and *in-situ* hybridization. *Heredity* 68: 473-478.

-
- Nieves-Aldrey JL, Fontal-Cazalla FM. 1999. Filogenia y evolución del orden Hymenoptera. Boletín de la Sociedad Entomológica Argentina 26: 459-474.
- Niyigibira EI, Overholt WA, Stouthamer R. 2004. *Cotesia flavipes* Cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) do not exhibit complementary sex determination: Evidence from field populations. Applied Entomology and Zoology 39: 717–725.
- Normark BB. 2003. The evolution of alternative genetic systems in Insects. Annual Review of Entomology 48: 397–423.
- Odierna G, Baldanza F, Aprea G, Olmo E. 1993. Occurrence of C-banding in metaphase chromosomes of *Encarsia berlesei* (Hymenoptera: Aphelinidae). Genome 36: 662-667.
- Ovruski S, Colin C, Soria A, Oroño L, Schliserman P. 2003. Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). Revista Sociedad Entomológica Argentina 62(3-4): 49-59.
- Ovruski SM, Aluja M, Sivinski J, Wharton R. 2000. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. Integrated Pest Management Reviews 5: 81-107.
- Ovruski SM, Fidalgo P. 1994. Use of parasitoids (Hym.) in the control of fruit flies (Dip.: Tephritidae) in Argentina: bibliographic review (1937-1991). IOBC/WPRS Bulletin 17(6): 84-92.
- Ovruski,S, Cancino JL, Fidalgo P, Liedo P. 1999. Perspectivas para la aplicación del control biológico de moscas de la fruta en Argentina. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 54: 1-12.
- Palomeque T, Carrillo JA, Muñoz-López M, Lorite P. 2006. Detection of a mariner-like element and a miniature inverted-repeat transposable element (MITE) associated with the heterochromatin from ants of the genus *Messor* and their possible involvement for satellite DNA evolution. Gene 371: 194–205.
- Palomeque T, Chica E, Cano M, Díaz de la Guardia R. 1988. Karyotypes, C-banding and chromosomal location of active nucleolar organizing regions in *Tapinoma* (Hymenoptera, Formicidae). Genome 30: 277-280.
- Palomeque T, Chica E, Cano M, Díaz de la Guardia R. 1990. Development of silver stained structures during spermatogenesis in different genera of Formicidae. Genetica 81: 51-58.
- Papeschi AG, Bressa MJ. 2006. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. Journal of Biological Research 5: 3-21.

-
- Papeschi AG. 1995. Correspondence between C-banding and Ag-NOR in the sex chromosomes of *Belostoma oxyurum* (Belostomatidae, Heteroptera). *Cytologia* 60: 291-295.
- Patterson JT, Porter LT. 1917. Studies on the biology of *Paracopidosomopsis*. II. Spermatogenesis of males reared from unfertilized eggs. *Biological bulletin of the marine biological laboratory Woods hole, Mass.* 33: 38-49.
- Pearson DL, Cassola F. 1992. World-wide species richness patterns of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae): indicator taxon for biodiversity and conservation studies. *Conservation Biology* 6(3): 376-391.
- Pemberton CE, Willard WF. 1918. A contribution to the biology of fruit fly parasites in Hawaii. *Journal of Agriculture Research* 15(8): 419-436.
- Pen I, Weissing FJ. 2002. Optimal sex allocation: steps towards a mechanistic theory. *En: Sex ratio: concepts and research methods.* Hardy ICW (ed.). Cambridge University Press. Cambridge. Pp 26-48.
- Pendas AM, Morón P, García-Vázquez E. 1993. Multi-chromosomal location of ribosomal RNA genes and heterochromatin association in brown trout. *Chromosome Research* 1: 63-67.
- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B. 2002. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annual Review of Genetics* 36: 233-278.
- Plohl M, Lucijanac-Justic V, Ugarkovic D. 1993. Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. *Genome* 36: 467-475.
- Poiré M, Périquet G, Beukeboom L. 1993. The hymenopteran way of determining sex. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 3: 357-361.
- Pompolo SG, Campos LAO. 1996. Karyotypes of two species of stingless bees, *Leurotrigona muelleri* and *Leurotrigona pusilla* (Hymenoptera, Meliponinae). *Revista Brasileira de Genética* 18(2): 181-184.
- Pompolo SG, Takahashi CS. 1990a. Chromosome numbers and C-banding in two wasp species of the genus *Polistes* (Hymenoptera, Polistine, Polistini). *Insectes Sociaux* 37(3): 251-257.
- Pompolo SG, Takahashi CS. 1990b. Karyotype of ten species of social wasps (Hymenoptera, Polistinae, Polybiini). *Revista Brasileira de Genética* 13(3): 469-477.
- Quicke DLJ. 1993. Principles and techniques of contemporary taxonomy. Blackie Acad Prof. Glasgow.
- Quicke DLJ. 1997. Parasitic wasps. Chapman and Hall. London.
- Ramadan MM, Wong TTY, Wong MA. 1991. Influence of parasitoid size and age on male mating success of opiines (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of fruit flies. *Biological Control* 1: 248-255.

-
- Rasnitsyn AP. 1980. The origin and evolution of Hymenoptera. Trudy Paleontologicheskogo Instituta. Akademiya nauk SSSR 174: 1-192.
- Reed KM, Phillips RB. 1995. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. Chromosoma 104: 242–251.
- Reed KM. 1993. Cytogenetic analysis of the Paternal Sex Ratio chromosome of *Nasonia vitripennis*. Genome 36: 157–161.
- Reeves A, Tear J. 2000. MicroMeasure for Windows, version 3.3. (Free program, distributed by the authors via <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/Micro-Measure>).
- Richards EJ, Elgin SC. 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. Cell 108: 489-500.
- Richards EJ, Vongs A, Walsh M, Yang J, Chao S. 1993. Substructure of telomere repeat arrays. *En: The chromosome*. Heslop-Harrison JS, Flavell RB (eds.). Bios Scientific Publisher. Oxford. Pp 115-125.
- Rocha MP, Cruz MP, Fernandes A, Waldschmidt AM, Silva-Junior JC, Pompolo SG. 2003. Longitudinal differentiation in *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Meliponini) chromosomes. Hereditas 138: 133–137.
- Rocha MP, Pompolo SDG, Dergam JA, Fernandes A, de Oliveira Campos LA. 2002. DNA characterization and karyotypic evolution in the bee genus *Melipona* (Hymenoptera, Meliponini). Hereditas 136(1): 19-27.
- Rocha MP, Pompolo SG, Fernandes A. 2007. *Melipona* – Seis décadas de citogenética. Bioscience Journal, Uberlândia 23(1): 111-117.
- Rocha MP, Pompolo SG. 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Genetics and Molecular Biology 21(1): 41-45.
- Roehrdanz R, Heilmann L, Senechal P, Sears S, Evenson P. 2010. Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. Insect Molecular Biology doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01006.x.
- Roubik DW. 2001. Searching for genetic pattern in orchid bees: a reply to Takahashi et al. Evolution 55: 1900–1901.
- Rousselet J, Chaminade N, Géri C, Hewitt GM, Lemeunier F. 1999. Chromosomal location of rRNA genes in *Diprion pini* detected by *in situ* hybridization. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 322(6): 461-466.
- Rousselet J, Géri C, Hewitt GM, Lemeunier F. 1998 The chromosomes of *Diprion pini* and *D. similis* (Hym.: Diprionidae): implications for karyotype evolution. Heredity 81: 573-578.

-
- Rousselet J, Monti L, Auger-Rozenberg M-A, Parker JS, Lemeunier F. 2000. Chromosome fission associated with growth of ribosomal DNA in *Neodiprion abietis* (Hymenoptera: Diprionidae). *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 1819-1823.
- Saccone G, Pane A, Polito LC. 2002. Sex determination in flies, fruit flies and butterflies. *Genetica* 116: 15–23.
- Sahara K, Marec F, Traut W. 1999. TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* 7: 449–460.
- Salin C, Deprez B, Van Bockstaele DR, Mahillon J, Hance T. 2004. Sex determination mechanism in the hymenopteran parasitoid *Aphidius rhopalosiphi* De Stefani-Peres (Braconidae: Aphidiinae). *Belgian Journal of Zoology* 134: 15-21.
- Sánchez A, Jiménez R, Burgos M, Stitou S, Zurita F, Diaz de la Guardia R. 1995. Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity* 75: 10-16.
- Sánchez L. 2008. Sex-determining mechanisms in insects. *International Journal of Developmental Biology*. 52: 837-856.
- Sanderson AR. 1988. Cytological investigation of parthenogenesis in gall wasps (Cynipidae, Hymenoptera). *Genetica* 77: 189–216.
- Santos IS, Costa MA, Mariano CSF, Delabie JHC, Andrade-Souza V, Silva JG. 2010. A cytogenetic approach to the study of neotropical *Odontomachus* and *Anochetus* ants (Hymenoptera: Formicidae) *Annals of the Entomological Society of America* 103(3): 424-429.
- Scheer U, Hock R. 1999. Structure and function of the nucleolus. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 385-390.
- Schliserman P, Ovrusky S, de Coll O. 2003. The establishment of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) in Misiones, northeastern Argentina. *Florida Entomologist* 86(4): 491-492.
- Schmid M, Guttenbach M. 1988. Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent bands in vertebrates. *Chromosoma* 97: 327-344.
- Schmid M, Steinlein C, Feichtinger W, Almeida CG, Duellman WE. 1988. Chromosome banding in amphibia. XIII Sex chromosomes, heterochromatin and meiosis in marsupial frogs (Anura, Hylidae). *Chromosoma* 97: 33–42.
- Segura DF, Viscarret MM, Ovruski S, Cladera JL. 2004. Olfactory cues used by a larval parasitoid of fruit flies to find its host. 5th MWGFFWH, Florida, EEUU.
- SENASA - Perú. 1999. “Mass rearing of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) and experimentally releases in four valleys in the Peruvian coast”. 3th WGFFWH Meeting, Guatemala, Guatemala.

-
- Shaposhnikov G, Kuznetsova V, Stekolshchikov A. 1998. Evolutionary tendencies and system of Aphididae. *En: Aphids in natural and managed ecosystems*. Nieto-Nafría JM, Dixon AFG (eds.). Universidad de León, León.
- Shaw SR. 1995. Braconidae. *En: The Hymenoptera of Costa Rica*. Hanson P, Gauld ID (eds.). Oxford University Press. Oxford. Pp. 431-463.
- Sivinski J. 1996. The past and potential of biological control of fruit flies. *En: Fruit fly pests: A world assessment of their biology and management*. McPheron BA, Steck GJ (eds). St. Lucie. Del Ray Beach, Florida. Pp 365-375.
- Snell GD. 1935. The determination of sex in *Habrobracon*. *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* 21: 446-453.
- Speicher BR, Speicher KG. 1940. The occurrence of diploid males in *Habrobracon brevicornis*. *The American Naturalist* 74: 379-382.
- Stack S, Herickhoff L, Sherman J, Anderson L. 1991. Staining Plant Cells with Silver. I. The Salt-Nylon Technique. *Biotechnic & Histochemistry* 66(2): 69-78.
- Stebbins GL. 1950. *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press. New York.
- Steiner WWM, Teig DA. 1989. *Microplitis croceipes*: genetic characterization and developing insecticide resistant biotypes. *Southwestern Entomology* 12: 71-87.
- Stille B, Dävring L. 1980. Meiosis and reproductive strategy in the parthenogenetic gall wasp *Diplolepis rosae* (L.) (Hymenoptera, Cynipidae). *Hereditas* 92: 353-362.
- Stouthamer R, Luck RF, Werren JH. 1992. Genetics of sex determination and the improvement of biological control using parasitoids. *Environmental Entomology* 21(3): 427-435.
- Sumner AT. 1990. *Chromosome banding*. Unwin Hyman Ltd. London.
- Sumner AT. 2003. *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Science. Malden.
- Suomalainen E, Saura A, Lokki J. 1987. *Cytology and Evolution in Parthenogenesis*. CRC. Boca Raton, Florida.
- Suzuki H, Sakurai S, Nishimura M, Kominami R, Moriwaki K. 1992. Compensatory changes in silver-stainability of nucleolar organizer regions in mice. *Japanese Journal of Genetics* 67: 217-232.
- Swanson CP, Merz T, Young MJ. 1981. *Cytogenetics: the chromosome in division, inheritance, and evolution*. 2nd edition. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Tautz D, Hancock JM, Webb DA, Tautz C, Dover GA. 1988. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 5: 366-376.
- Terán HR. 1977. Comportamiento alimentario y su correlación a la reproducción en hembras de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera, Trypetidae). *Revista Agronómica N. O. A.* 14: 17-34.

-
- Terán López E. 1983. Efecto de la edad del huésped sobre la preferencia y el parasitismo de *Biosteres longicaudatus* en larvas de *Anastrepha ludens* (Loew) y *Musca domestica* (Linn.). Tesis. Universidad de Tamaulipas, Mexico.
- Turica A. 1968. Lucha biológica como medio de control de las moscas de los frutos. Revista IDIA, Argentina 241: 29-38.
- van Driesche RG, Bellows TS. 1996. Biological control. Chapman and Hall. New York.
- van Wilgenburg E, Diressen G, Beukeboom LW. 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design? *Frontiers in Zoology* 3 (1): 1-15.
- Vargas RI, Ramadan M, Hussain T, Mochizuki N, Bautista RC, Stark JD. 2002. Comparative demography of six fruit (Diptera: Tephritidae) parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 25: 30-40.
- Viktorov GA. 1976. *Ekologiya parazitov-entomofagov* (The Ecology of Entomophagous Parasites). Nauka, Moscow.
- Viscarret MM, La Rossa R, Segura DF, Ovruski DF, Cladera JL. 2006a. Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* 36: 147-153.
- Viscarret MM, Carabajal Paladino LZ, Juri ML, Cladera JL. 2006b. Dosis de irradiación para la obtención de mutantes en el parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). XXXV Congreso Argentino de Genética SAG, San Luis, Argentina.
- Vitková M. 2007. Structural and molecular differentiation of sex chromosomes in Lepidoptera. PhD thesis. University of South Bohemia.
- Vitturi R, Colomba MS, Barbieri R, Zunino M. 1999. Ribosomal DNA location in the scarab beetle *Thorectes intermedius* (Costa) (Coleoptera: Geotrupidae) using banding and fluorescent in-situ hybridization. *Chromosome Research* 7(4): 255-260.
- Vitturi R, Colomba MS, Caputo V, Sparacio I, Barbieri R. 1997. High heterochromatin content in somatic chromosomes of two unrelated species of diplopoda (Myriapoda). *Chromosome Research* 5: 407-412.
- Wachtler F, Hopman AH, Wiegant J, Schwarzacher HG. 1986. On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei: Studies with a new, non-autoradiographic in situ hybridization method. *Experimental Cell Research* 167(1): 227-240.
- Werner JE, Kota RS, Gill BS. 1992. Distribution of telomeric repeats and their role in the healing of broken chromosome ends in wheat. *Genome* 35: 844-848.

-
- Werren JH, Beukeboom LW. 1998. Sex determination, sex ratios, and genetic conflict. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 29: 233-261.
- Werren JH, Hatcher MJ, Godfray HCJ. 2002. Maternal-offspring conflict leads to the evolution of dominant zygotic sex determination. *Heredity* 88: 102-111.
- Werren JH, Skinner SW, Charnov EL. 1993. The evolution of inbreeding in a haplodiploid organism. *En: The natural history of inbreeding and outbreeding*. Thornhill NW (ed.). Univ. of Chicago Press. Chicago, IL. Pp. 42–94.
- Werren JH. 1993. The evolution of inbreeding in haplodiploid organisms. *En: The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives*. Thornhill NW (ed.). University of Chicago Press. Chicago. Pp. 42–59.
- West SA, Reece SE, Sheldon BC. 2002. Sex ratio. *Heredity* 88: 117-124.
- White MJD. 1973. *Animal cytology and evolution*. 3rd edition. Cambridge University Press. Cambridge.
- Whitfield JB. 1998. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 43: 129-151.
- Whiting PW, Whiting AR. 1925. Diploid males from fertilized eggs in Hymenoptera. *Science* 62: 437–438.
- Whiting PW. 1939. Sex determination and reproductive economy in *Habrobracon*. *Genetics* 28: 365–382.
- Whiting PW. 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* 28: 365-382.
- Wilson EB. 1905. The chromosomes in relation to the determination of sex in insects. *Science* N.S. 22: 500-502.
- Wilson EO. 1987. The little things that run the world (the importance and conservation of invertebrates). *Conservation Biology* 1: 344–346.
- Wong TTY, Ramadan YMM. 1992. Mass rearing biology of larval parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of tephritid flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *En: Advances in insect rearing for research and pest management*. Anderson T E, Leppla NC (eds.). Westview Press.
- Woodcock CL, Dimitrov S. 2001. Higher order structure of chromatin and chromosomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 11: 130-135.
- Wu Z, Hopper KR, Ode PJ, Fuester RW, Tuda M, Heimpel GE. 2005. Single- locus complementary sex determination absent in *Heterospilus prosopidis* (Hymenoptera: Braconidae). *Heredity* 95: 228-234.

-
- Zayed A, Packer L. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Science* 102(30): 10742–10746.
- Zayed A. 2004. Effective population size in Hymenoptera with complementary sex determination. *Heredity* 93: 627–630.