

Evaluación de métodos de extracción de ADN y su efecto en la amplificación de marcadores moleculares de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en Colombia

Isabella Valencia Rueda

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Director

Claudia María Holguín Aranzazu

Doctorado en Ciencias Vegetales y Ambientales

Codirector

Sergio Andrés Marchant Rojas

Doctorado en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

A mis padres y mi hermana,

Quienes me enseñaron el ingrediente secreto.

Agradecimientos

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que fueron una parte clave en la realización de este proyecto, su invaluable apoyo hizo posible este logro académico.

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) por la financiación de esta pasantía.

A mis directores, Claudia Holguín y Sergio Marchant por su orientación y aportes.

A Leonardo Villalba, por acompañarme en los primeros pasos de mi aprendizaje en la biología molecular.

A la Universidad Industrial de Santander y a todos los profesores que hicieron parte de la formación de mi pensamiento científico, su vocación e inspiración me ha dejado las herramientas para ir en la búsqueda de más conocimiento.

A mis amigos, Silvia Toloza, Juan Pablo Saurith y Sofía Coral, que me vieron crecer todos estos años y me dieron su apoyo incondicional.

A mi familia, mis padres, mi hermana y Tilin, que son la fuente inagotable de sabiduría en mi vida y a quienes les debo todo.

Tabla de Contenido

1. Introducción	10
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo general	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Competencias	17
4. Metodología	18
4.1. Obtención de individuos de <i>Ceratitis capitata</i>	18
4.2. Protocolos de extracción de ADN	18
4.2.1. Método de bromuro hexacetil- trimetil amonio (CTAB)	19
4.2.1.1. Ajustes protocolo de extracción bromuro hexacetil- trimetil amonio (CTAB) con PVP	19
4.2.1.2. Protocolo de extracción bromuro hexacetil- trimetil amonio (CTAB) con PVP ajustado.....	19
4.2.2. Kit de extracción DNeasy Qiagen	20
4.3. Visualización y cuantificación de ADN	21
4.4. Análisis de datos	21
4.5. Amplificación de un gen mitocondrial	21
5. Resultados	23
5.1. Ajustes protocolo CTAB-PVP	23
5.2. Protocolo estandarizado CTAB-PVP	26

5.3. ADN extraído con el Kit DNeasy	27
5.4. Cuantificación de ADN.....	28
5.5. Amplificación del marcador molecular N5N4.....	30
6. Discusión	37
6.1. Concentración de ADN con los métodos de extracción	37
6.2. Pureza obtenida con los métodos de extracción	39
6.3. Inhibidores de la PCR	40
7. Conclusiones	43
8. Recomendaciones	44
Referencias bibliográficas.....	45

Lista de Tablas

	Pag.
Tabla 1. <i>Promedio y desviación estándar de los cuatro experimentos realizados de extracción de ADN con el método CTAB</i>	25
Tabla 2. <i>Concentración de ADN y Absorbancia (260/280 y 260/230) en diferentes tejidos de mosca del mediterráneo (adulto completo, cabeza-tórax, pata y larvas) con dos métodos de ADN (DNeasy kit y CTAB)</i>	29

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Adulto de Ceratitis capitata en vista lateral.....</i>	11
Figura 2. <i>Estadio larval de Ceratitis capitata.....</i>	12
Figura 3. <i>Electroforesis de la extracción de ADN con el método CTAB experimento 1.....</i>	23
Figura 4. <i>Electroforesis de la extracción de ADN con el método CTAB experimento 2.....</i>	24
Figura 5. <i>Electroforesis de la extracción de ADN con el método CTAB experimento 3.....</i>	24
Figura 6. <i>Electroforesis de la extracción de ADN con el método CTAB experimento 4.....</i>	26
Figura 7. <i>Electroforesis de las extracciones de ADN con el protocolo estandarizado con el método CTAB.....</i>	27
Figura 8. <i>Electroforesis de las extracciones de ADN realizadas con el Kit DNeasy.....</i>	28
Figura 9. <i>Amplificación del marcador molecular N5N con sitios no específicos.....</i>	31
Figura 10. <i>Amplificación del marcador molecular N5N por medio de diluciones.....</i>	32
Figura 11. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de tres tejidos.....</i>	32
Figura 12. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de ADN de individuo completo.....</i>	33
Figura 13. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de ADN de cabeza – tórax</i>	33
Figura 14. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de ADN de larvas.....</i>	35
Figura 15. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de ADN de pata por el método CTAB..</i>	35
Figura 16. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de ADN de pata por el método CTAB..</i>	36
Figura 17. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de ADN de pata por el método CTAB..</i>	36
Figura 18. <i>Amplificación del marcador molecular N5N de ADN de pata extraído con el Kit DNeasy</i>	37

Resumen

Título: Evaluación de métodos de extracción de ADN y su efecto en la amplificación de marcadores moleculares de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) de Colombia^{1*}

Autor: Isabella Valencia Rueda ^{2*}

Palabras Clave: diagnóstico molecular, genética, mosca del mediterráneo, PCR

El uso de herramientas moleculares ha permitido un avance significativo en el diagnóstico, monitoreo y control de plagas en cultivos agrícolas. Un paso fundamental para el éxito de estos procesos es el uso de métodos que permitan la identificación de especies de manera efectiva y a un bajo costo. La mosca del mediterráneo, *Ceratitis capitata*, es una plaga cuarentenaria reconocida a nivel mundial por su alta polifagia, atribuida principalmente a su alta capacidad de adaptación y dispersión. A pesar de la importancia de este insecto-plaga, en Colombia su diagnóstico en etapas larvales, y la realización de estudios poblacionales y filogenéticos son incipientes. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue estandarizar un método efectivo y eficiente para la extracción de ADN y amplificación de un marcador mitocondrial de *C. capitata* para las poblaciones de Colombia. Para esto, se comparó la efectividad del método de extracción CTAB con el kit comercial DNeasy en el aislamiento de ADN en cuatro tejidos (individuo adulto completo, cabeza-tórax, pata y estadio larval). A través de la visualización en geles de agarosa y la cuantificación del ADN, se encontró que ambos métodos de extracción son efectivos para la extracción de ADN de los diferentes tejidos, siendo el método CTAB más adecuado para obtener mayor cantidad ADN, mientras que el kit DNeasy permite una menor contaminación. Los dos métodos evaluados permitieron obtener producto PCR adecuado para secuenciación del marcador mitocondrial N4N5. Al considerar las ventajas del método de extracción utilizando CTAB con un bajo costo por muestra y alta efectividad, se recomienda el método CTAB para el estudio molecular de *C. capitata* en Colombia. Se espera que este estudio sea parte fundamental para el estudio genético de esta importante plaga a nivel nacional.

¹Trabajo de grado

²Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Directora: Claudia Holguín. Ciencias de las Plantas y del Medio Ambiente con énfasis en nematología. Codirector: Sergio Marchant. Doctor en Ciencias Biológicas.

Abstract

Title: Evaluation of DNA Extraction Methods and their Effect on the Amplification of Molecular Markers in *Ceratitits capitata* (Diptera: Tephritidae) from Colombia

Author(s): Isabella Valencia Rueda ^{3*4*}

Key Words: Molecular identification, genetics, Mediterranean fruit fly, PCR

The use of molecular tools has allowed significant progress in the diagnosis, monitoring and control of pests in agricultural crops. A fundamental step for the success of these processes is the use of methods that allow the species identification in an effective and low-cost manner. The Mediterranean fruit fly, *Ceratitits capitata*, is a quarantine pest recognized worldwide for its high polyphagia, mainly attributed to its high capacity for adaptation and dispersal. Despite the importance of this insect-pest, in Colombia its diagnosis in larval stages, and studies on population genetics and phylogeny are incipient. For this reason, the objective of this work was to standardize an effective and efficient method for DNA extraction and amplification of a mitochondrial marker of *C. capitata* for Colombian populations. For this purpose, the effectiveness of the CTAB extraction method was compared with the commercial kit DNeasy in the isolation of DNA in four tissues (complete adult, head-thorax, leg and larval stage). Through visualization in agarose gels and DNA quantification, it was found that both extraction methods are effective for DNA extraction from the different tissues, with the CTAB method being more suitable for obtaining more DNA, while the DNeasy kit allows less contamination. These two methods allowed obtaining PCR product suitable for sequencing of the mitochondrial marker N4N5. Considering the advantages of the extraction method using CTAB with a low cost per sample and high effectiveness, the CTAB method is recommended for the molecular study of *C. capitata* in Colombia. It is expected that this study will be a fundamental part of the genetic study of this important pest at the national level.

³Bachelor's degree

⁴Faculty of Sciences. School of Biology. Biology. Claudia Holguín Aranzazu. Ph.D. in Biological Sciences. Sergio Marchant Rojas. Ph.D. in Biological Sciences.

1. Introducción

El orden Diptera incluye especies comúnmente conocidas como moscas y zancudos, y corresponde a un grupo de insectos holometábolos con metamorfosis completa, con una gran diversidad de especies, características ecológicas y formas (Skevington & Dang, 2002). Estos insectos se han adaptado a múltiples nichos, cumpliendo funciones como polinizadores (Szymank, 2011), depredadores (Coupland., et al, 2004), necrófagos (Vasconcelos et al., 2012), vectores (Santiago-Alarcon et al., 2012) y parásitos (Alcantara et al., 2019).

En los dípteros, la familia Tephritidae agrupa cerca de 5.000 especies de moscas de la fruta de las que la gran mayoría son fitoparásitos y 257 son potenciales plagas de cultivos (Epsa, 2019). Teniendo en cuenta su gran impacto en la agricultura, se han llevado a cabo múltiples estrategias para su control poblacional, incluyendo el uso de agroquímicos (Abrol & Shankar, 2015), el manejo de los simbiosis bacterianos del intestino de las moscas (Noman, 2019), y el uso de la técnica del insecto estéril (Knipling, 1959).

La mosca del mediterráneo, *Ceratitis capitata* (Weidmann, 1824) (Diptera: Tephritidae), es un díptero originario de África, considerado uno de los insectos más importantes a nivel mundial por ser un caso de polifagia extrema (Casey et al., 2001), con cerca de 304 especies de plantas hospederas (Liquido et al. 2014). Presenta adaptaciones para sobrevivir en un amplio rango climático (Weldon et al., 2018), resistencia a pesticidas (Magaña et al., 2007; Guillem-Amat et al., 2020) y una alta variabilidad genética (Malacrida et al., 1996; Karsten et al., 2015), convirtiéndola en una plaga con un alto impacto en la agricultura (Weldon et al., 2016). La extensa distribución de esta especie en regiones como Sudamérica, Centroamérica, Australia, Hawaii y África (Badii et al., 2015), se atribuye en primer lugar, a su éxito reproductivo basado en el

parasitismo y, adicionalmente, la comercialización nacional e internacional de frutos infestados que ha potenciado su diseminación alrededor del mundo (Malacrida et al., 2007; Karsten et al., 2013). Por esta razón, es una plaga cuarentenaria en un gran número de países del mundo (EPPO, 2011), incluida Colombia (ICA, 2019).

Morfológicamente, *C. capitata* en su estado adulto se caracteriza por poseer un par de alas anchas, hialinas con marcas de color negro, marrón y amarillo que semejan la punta de una flecha, frecuentemente con una franja discal, una costal y otra en la vena DM-Cu y celdas basales con puntos negros en su interior. Presentan, además, abdomen de forma ovalada, con color amarillo rojizo, franjas amarillas y negras, setas negras finas y dos bandas angostas transversales hacia su extremo anterior (Hernández-Ortiz et al., 2010; Senasica, 2018) (Figura 1).

Figura 1.

Adulto de Ceratitis capitata en vista lateral. Tomado de: Fruit Fly ID Australia.

<https://www.fruitflyidentification.org.au/>



En su fase larval *Ceratitidis capitata* posee una morfología cilíndrica, de color blanco y ganchos bucales anteriores (Berg et al.1979) (Figura 2). En este estado puede llegar a afectar un

gran número de especies, lo cual influye de manera negativa en la exportación y comercialización nacional de frutos (Vargas et al., 2014).

Figura 2.

Estadio larval de Ceratitis capitata. Fotografiado por Jeffery Lotz. Disponible en: www.forestryimages.org.



En Colombia, uno de los cultivos más afectados por la mosca del mediterráneo es el durazno (*Prunus persica* L.) (Afiá et al., 2018) debido a la alta concentración de azúcar y componentes volátiles en los frutos, que resultan muy llamativos para esta especie (Hernandez et al., 1999; Tabilio et al., 2013). Según lo registrado por la Encuesta Nacional Agropecuaria, en Colombia se llega a producir 30.038 toneladas de durazno al año (ENA, 2019), de las que el 40% de las pérdidas se estima es debido a *C. capitata* (Conpes, 2008). Como resultado del gran impacto de esta plaga, es posible encontrar grandes infestaciones en las principales zonas productoras de durazno, como el departamento de Norte de Santander, seguido por Santander y Boyacá (Villamizar Antonilez, 2016).

En los cultivos donde está presente, los adultos de *C. capitata* son capturados por medio de trampas e identificados por las características morfológicas mencionadas anteriormente (Potamitis et al., 2017). Sin embargo, para el caso de las larvas, estas se deben mantener en los frutos infestados bajo condiciones ideales de temperatura y humedad, que permitan el desarrollo

y la emergencia de individuos adultos para su posterior identificación (de Aquino & Joachim-Bravo, 2014). Aunque estos métodos son efectivos, el ciclo de vida de la mosca del mediterráneo tiene una duración de 25 a 35 días desde huevo hasta la emergencia de adultos (Costa et al., 2011), por lo que la identificación taxonómica a partir de las larvas es un proceso lento y dispendioso.

Los estudios que emplean métodos de identificación temprana han sido fundamentales para la prevención del crecimiento poblacional de esta mosca (Karsten et al., 2013). A diferencia del caso de los adultos, que es posible observar caracteres morfológicos claros (Christenson et al., 1960), los estadios larvales de *C. capitata* presentan una alta semejanza con otros géneros de dípteros como *Anastrepha*, lo que dificulta su reconocimiento (Berg et al., 1979) y obliga a la cría de larvas hasta la emergencia de adultos para una correcta identificación. Sin embargo, el desarrollo de técnicas moleculares permite la identificación a nivel de especie desde estadios larvales, y se puede realizar de manera inmediata, sin necesidad del reconocimiento morfológico del adulto, a través de la amplificación y análisis de regiones del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gasparich et al., 1995).

A partir de marcadores moleculares altamente conservados o regiones hipervariables, se han comparado entre las secuencias genéticas amplificadas con bases de datos genómicos donde se haya reportado previamente a la especie (Galtier et al., 2009). Algunos de los marcadores más usados son los provenientes de ADN mitocondrial pues son considerados un recurso importante para el reconocimiento y estudio poblacional de especies como la mosca del mediterráneo (Elfékih et al., 2010; Drosopoulou et al., 2017). Una de las principales razones es su alta tasa evolutiva, que resulta adecuada para la identificación entre especies de un mismo género (Barr et al., 2012) y su resistencia a la degradación (Kang & Hamasaki, 2002).

En especial para *C. capitata*, ha sido estudiado el gen de la región Citocromo Oxidasa 1 (COI) (Barr et al., 2012; Rajabiyan et al., 2015; Arias et al., 2018; Dermauw et al., 2022) y las regiones mitocondriales ND5-tRNA-ND4 (subunidad 5 de la NADH-deshidrogenasa, Histidinina-tRNA y subunidad 4 de la NADH-deshidrogenasa) (Barr et al., 2009; Rajabiyan et al., 2015, Ruiz et al., 2020). A partir de este último, se han desarrollado investigaciones con las que se han reconocido cerca de 231 haplotipos de seis regiones geográficas (Ruiz et al., 2020), por lo que el uso de este marcador puede ser considerado como el más idóneo para un análisis poblacional de esta plaga.

Para investigar *C. capitata* en Colombia, es necesaria la evaluación de métodos moleculares que permitan la obtención muestras de ADN de manera económica y eficiente para que sean útiles para su posterior análisis. Dentro de los métodos de extracción de ADN, se puede encontrar una gran diversidad de procedimientos y reactivos que están asociados a un amplio rango de costos (Ha et al., 2015; Abdel-Latif & Osman, 2017). Aunque los kits comerciales ofrecen una alternativa más rápida y conveniente en términos de tiempo y esfuerzo, el desarrollo de estudios genético poblacionales de insectos, como los necesarios en la mosca del mediterráneo, implica el procesamiento de un gran número de muestras (Margam et al., 2010), lo que puede resultar inviable para muchas investigaciones debido a su alto costo. Además, objetos de estudio como insectos dípteros, implican la influencia de un número de variables determinantes en procesos como la extracción de ADN. Dentro de estas se encuentra una menor cantidad de ADN en comparación a otros organismos (Richards & Murali, 2015), un exoesqueleto recubierto de quitina (Moussian et al., 2005) y la presencia de agentes externos como hongos y bacterias que pueden complicar el aislamiento de ADN (Konstantopoulou & Mazomenos, 2005; Cappelli et al., 2022). Debido a esto, técnicas como la extracción con bromuro de hexacetil-trimetil amonio (CTAB) han demostrado

ser efectivas (Rajabiyan et al., 2015) y representan una solución factible por ser asequible y de bajo costo.

Teniendo en cuenta esto, se hace necesaria la estandarización de un método de extracción de ADN que permita la identificación molecular de la mosca del mediterráneo en sus diferentes estadios de desarrollo con un bajo costo. Aunque es común, la amplificación de una región de ADN para la identificación molecular de una especie, para *C. capitata* en Colombia no se ha implementado. Por este motivo, la puesta a punto de un protocolo de extracción y el ajuste de las condiciones de amplificación de la región mitocondrial N5N4, servirá como base para el reconocimiento de la especie de manera rápida y eficiente, y permitirá un avance sustancial en la investigación poblacional a través de marcadores genéticos de esta importante plaga.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Estandarizar un método para la extracción de ADN y amplificación de un marcador molecular mitocondrial a partir de tejidos de diferentes estados de desarrollo de *Ceratititis capitata* provenientes de zonas productoras de durazno en Colombia.

2.2 Objetivos Específicos

Caracterizar dos métodos para la extracción de ADN en tejidos de diferentes estadios (adulto y larval) de *C. capitata*.

Comparar la efectividad del método en la extracción de ADN en la amplificación de un marcador molecular mitocondrial previamente reportado del genoma de *C. capitata*.

3. Competencias

1. Aplica técnicas de laboratorio para extraer ADN, llevar a cabo la amplificación de marcadores moleculares mediante PCR y realizar la visualización por electroforesis con el propósito de analizar material genético en un entorno de laboratorio.
2. Analiza de manera crítica los resultados obtenidos, con el fin de interpretar y sacar conclusiones relevantes en contextos de investigación científica o análisis de datos.
3. Realiza una revisión de la literatura científica relevante con el propósito de contextualizar y discutir de manera informada los resultados obtenidos de investigación o análisis científico.
4. Redacta informes y documentos con rigor científico, asegurando la correcta comunicación de los hallazgos, metodología y conclusiones en contextos académicos o científicos.

4. Metodología

4.1. Obtención de individuos de *Ceratitis capitata*

Los individuos obtenidos para este estudio hacen parte de muestreos realizados en el marco del proyecto titulado “Análisis de factibilidad para la implementación de la técnica del insecto estéril de *Ceratitis capitata* en Colombia”, llevados a cabo por La Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA. Para esto, en el año 2022, se muestreó una finca productora de durazno, ubicada ($7^{\circ}13'26.9''N$ $72^{\circ}37'26.5''$) en Cócota, Norte de Santander, con alto nivel de infestación de la plaga. En un lote de la finca se ubicaron trampas tipo Jackson y Mc Phail para la captura de los adultos. Adicionalmente, se colectaron frutos de durazno infestados con larvas de mosca del mediterráneo. Los adultos y frutos colectados se transportaron al laboratorio de entomología del Centro de Investigación La Suiza de AGROSAVIA en Rionegro, Santander. En el laboratorio, los frutos se ubicaron en cámaras de cría para la obtención de larvas y adultos. Las larvas y los adultos obtenidos se transfirieron a viales de vidrio con alcohol al 96% hasta la extracción del ADN.

4.2. Protocolos de extracción de ADN

Los procedimientos de extracción de ADN total fueron llevados a cabo en los estados larval y adulto de *C. capitata*. Para la estandarización del protocolo de extracción en *C. capitata*, se utilizaron dos metodologías (1) el método de bromuro hexacetil-trimetil amonio (CTAB) con polivinilpirrolidona (PVP) y (2) el kit comercial de Qiagen DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Valencia, CA), los cuales ya se han utilizado para la extracción de ADN de insectos (Doyle et al., 1987; Chen et al., 2010; Asokan et al., 2011; Andrews et al., 2022).

4.2.1. Método de bromuro hexacetil- trimetil amonio (CTAB) con PVP

4.2.1.1. Ajustes protocolo de extracción (CTAB) con PVP

El método CTAB-PVP fue realizado teniendo en cuenta la metodología de extracción de ADN propuesta por Doyle et al., (1990) y Calderón et al., (2010) para insectos polífagos. Con el fin de aumentar la efectividad del método de extracción, inicialmente se modificaron variables como tiempo de incubación, precipitación y secado, lo cual se comprobó por medio de la visualización en geles de agarosa 1.2% y la cuantificación de ADN.

En primer lugar, se realizaron extracciones de ADN con tiempos de incubación de 1 hr y 30 min, con una precipitación por 6 hrs finalizando con 1 hr de secado. Luego, se modificó el tiempo de incubación a 3 hrs, seguido por un aumento en el tiempo de precipitación a 20 hrs y 2 hrs de secado de las muestras para un total de cuatro experimentos independientes. Para cada procedimiento se utilizaron diferentes tejidos de individuos adultos (adulto completo, cabeza-tórax , patas) y larvas, con 3 repeticiones por cada tipo de tejido.

4.2.1.2. Protocolo de extracción bromuro hexacetil- trimetil amonio (CTAB) con PVP ajustado

Dado que el protocolo que contemplaba el mayor tiempo de incubación, precipitación y secado presentó la mayor concentración y calidad de ADN, se estableció como la referencia para los experimentos posteriores con el método de CTAB. Para esto, se llevaron a cabo comparaciones utilizando 5 muestras por cada uno de los 4 tejidos usados: adulto completo, cabeza-tórax, patas y larvas. Cada muestra fue ubicada en un tubo de 1.5 mL, en el que se homogeneizaron los tejidos con ayuda de un macerador y 500 μ L de buffer de lisis (1% w/v CTAB; 1M NaCl; 100 mM Tris;

20 mM EDTA; 1% w/v polyvinylpyrrolidona, PVP). El β -mercaptoethanol (2% v/v), fue agregado a la solución justo antes de dar inicio al procedimiento.

Se incubaron las muestras por 3 hrs a 55°C realizando mezcla por inversión cada hr. Se agregaron 500 μ L de cloroformo: isoamílico (24:1 v/v), se mezcló 5 veces por inversión y se centrifugaron las muestras a 14.800 rpm por 10 min. De las tres fases resultantes, se extrajo la fase acuosa (~ 300 μ L) y se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 μ L procurando no intervenir en la fase central que corresponde a proteínas que podrían contaminar las muestras. Posteriormente se agregaron 28 μ L de acetato de amonio. Para la precipitación del ADN, se agregaron 204 μ L de isopropanol frío (-22°C) y se refrigeraron las muestras por 20 hrs a una temperatura de -22°C.

Una vez cumplido este tiempo, se centrifugó a 14.800 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante conservando el pellet en el fondo del tubo. Se agregaron 700 μ L de etanol al 96% y se centrifugó por 1 minuto a 14.800 rpm. Se desechó el sobrenadante y se repitió el procedimiento anterior con etanol frío al 70%. y se incubaron los tubos a 53°C por 2 hrs con la tapa abierta. Una vez secas las muestras, se suspendió el pellet con 100 μ L de buffer AE proveniente del kit de extracción DNeasy Qiagen (QIAGEN, Valencia, CA). Finalmente, para disolver el pellet, se incubaron las muestras por una hr adicional y se realizó mezcla por inversión 5 veces para resuspender el pellet.

4.2.2 Kit de extracción DNeasy Qiagen

El procedimiento realizado con el Kit de extracción DNeasy (Qiagen, Valencia, CA), se llevó a cabo teniendo en cuenta las especificaciones del elaborador para tejidos de animales. El volumen de la dilución final se modificó a 100 μ L de buffer AE. Por cada método de extracción de ADN se utilizaron larvas y adultos individuales.

Para el caso de los adultos, se evaluó la efectividad de la extracción del ADN de tres tejidos: 1) individuo completo, 2) cabeza-tórax y 3) patas, mientras que, para los estadios larvales, se extrajo ADN de individuos completos. En todos los casos, se utilizaron 5 individuos por tratamiento y las soluciones finales de ADN se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análisis.

4.3. Visualización y cuantificación de ADN

Para estimar la calidad del ADN de cada una de las muestras, se utilizaron tres métodos: 1) visualización en geles de agarosa, 2) cuantificación de la concentración de ADN μL y 3) por medición de la proporción de absorbancia (A_{260}/A_{280}). La visualización en geles de agarosa se realizó al 1.2% con buffer TBE y se llevó a cabo para todas las muestras extraídas por los diferentes métodos. La cuantificación y evaluación de la calidad en los espectros 260/280 y 230/280 se realizó por medio de un espectrofotómetro DeNovix.

4.4. Análisis de datos

Los valores de concentración de ADN y los espectros 260/280 y 260/280, se utilizaron para evaluar diferencias significativas entre los cuatro tratamientos y entre los dos métodos de extracción estudiados. Teniendo en cuenta que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad, se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas. Para ello el software R (R Core Team, 2021) fue empleado para llevar a cabo un análisis de varianza mediante el test de Kruskal-Wallis, seguido de un test de Wilcoxon para realizar comparaciones post hoc.

4.5. Amplificación de un marcador mitocondrial

Para verificar la efectividad del ADN aislado de los diferentes tejidos se realizó la amplificación de una región mitocondrial ampliamente reportada en la literatura para *C. capitata*,

N5N4, correspondiente a un fragmento de 700 pb (Barr et al., 2006; Ruiz et al., 2020). Por medio de los cebadores N5-J-7908 5'-ACGATTAATATTGATATCTCC-3' y N4-N-8628 5'-TGGTCATGGATTATGTTC-3' se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con modificaciones en las condiciones encontradas en la literatura dependiendo de los tejidos evaluados.

En el caso de las muestras de pata, se utilizó un volumen final para la reacción de 20µL que contenía 1x buffer, 2Mm MgCl₂, 0,2 de cada Dntp, 0,4Um de cada primer y 0.625 unidades de Taq polimerasa (Bioline) con 1 µL de ADN de cada muestra. El perfil térmico inició con una fase de desnaturalización a 94°C por 3 min, seguido de 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52° C por 1 minuto de alineamiento y la fase de extensión a 72°C por 1 minuto, finalizando con 72°C por 30 min.

Para las muestras de cabeza-tórax e individuo completo, fue necesaria la modificación de la concentración de reactivos y del ADN empleado. En primer lugar, la concentración de cloruro de Mg²⁺ se redujo a la mitad. Además, el ADN se diluyó en una proporción 1:100 y por medio de un espectrofotómetro, se midió su concentración final. A partir de estas condiciones, se realizó el procedimiento de amplificación con el perfil térmico para muestras de pata.

La amplificación de las muestras con el tratamiento de estadio larval se llevó a cabo con la concentración de los reactivos inicial (1x buffer, 2Mm MgCl₂, 0,2 de cada dNTP, 0,4 Um de cada cebador y 0.625 unidades de Taq polimerasa (Bioline) con 1 µL de ADN de cada muestra). En cuanto a los ciclos de temperaturas utilizados, se optó por el protocolo descrito por Ruiz et al., (2020) en el que se utilizan 50°C para el alineamiento. Todas las muestras amplificadas se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2%.

5. Resultados

5.1. Ajustes protocolo CTAB-PVP

A partir de las extracciones realizadas con el método CTAB-PVP, la visualización de las muestras en geles de agarosa no mostró ADN para los casos en los que fue utilizado tiempo de incubación de una hr y media (Figura 3) y precipitación de 6 hrs (Figura 4). Por otra parte, los procedimientos realizados con un mayor tiempo de incubación (Figura 5) y precipitación resultaron en mayores cantidades de ADN (Figura 6). Lo promediado de la cuantificación por medio de espectrofotometría permitió obtener la concentración del ADN resultante para cada tejido en los cuatro protocolos mencionados anteriormente (Tabla 1). Adicionalmente, de los cuatro experimentos la mayor pureza de las muestras en las absorbancias 260/280 y 260/230 se obtuvo en el experimento con mayor tiempo de secado (Figura 6).).

Figura 3.

Extracción de ADN con el método CTAB (Tiempo de incubación 1 hr y 30 min, 6 hrs de precipitación y 1 hr de secado). Marcador de peso molecular 1Kb. Los pozos corresponden a ADN extraído de 1-3 cabeza-tórax, 4-6 individuo completo, 7-9 pata, 10-12 larva y 13 control negativo.

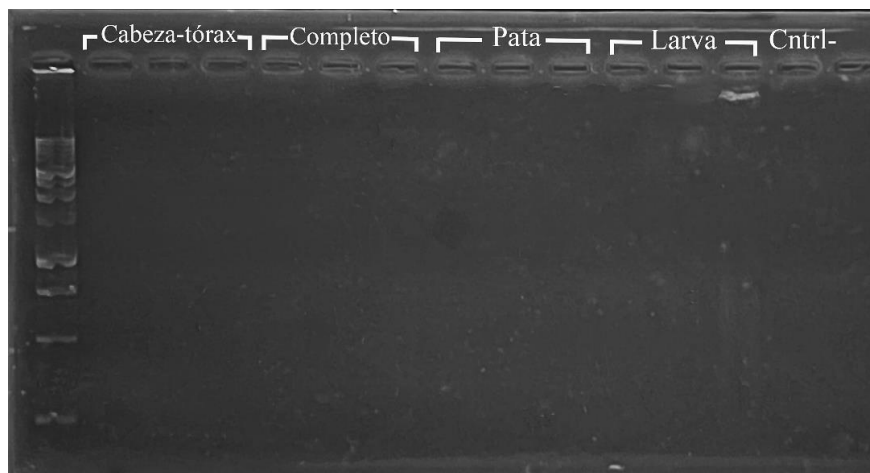
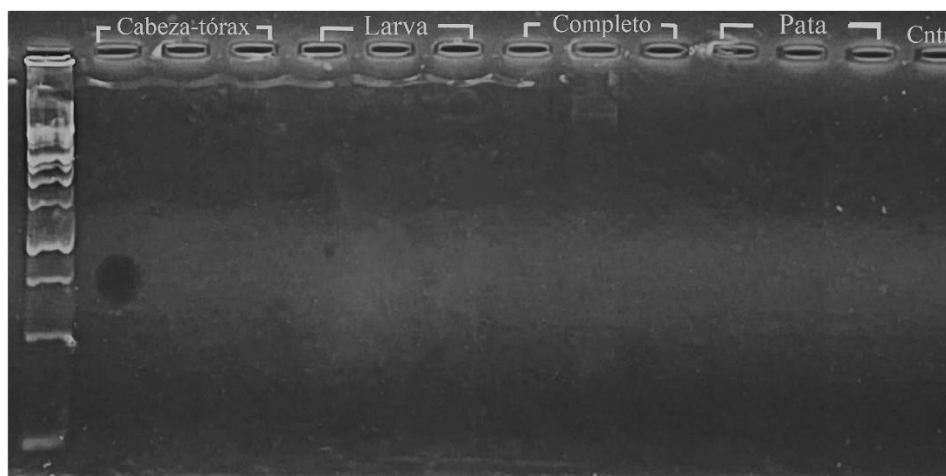


Figura 4.

Extracción de ADN con el método CTAB (Tiempo de incubación 3 hrs, 6 hrs de precipitación y 1 hr de secado). Marcador de peso molecular 1Kb. Los pozos corresponden a ADN extraído de 1-3 cabeza-tórax, 4-6 larva, 7-9 individuo completo, 10-12 pata y 13 control negativo.

**Figura 5.**

Extracción de ADN con el método CTAB (Tiempo de incubación 3 hrs, 20 hrs de precipitación y 1 hr de secado). Marcador de peso molecular 1Kb. Los pozos corresponden a ADN extraído de 1-3 cabeza-tórax, 4-6 larva, 7-9 individuo completo, 10-12 pata y 13 control negativo.

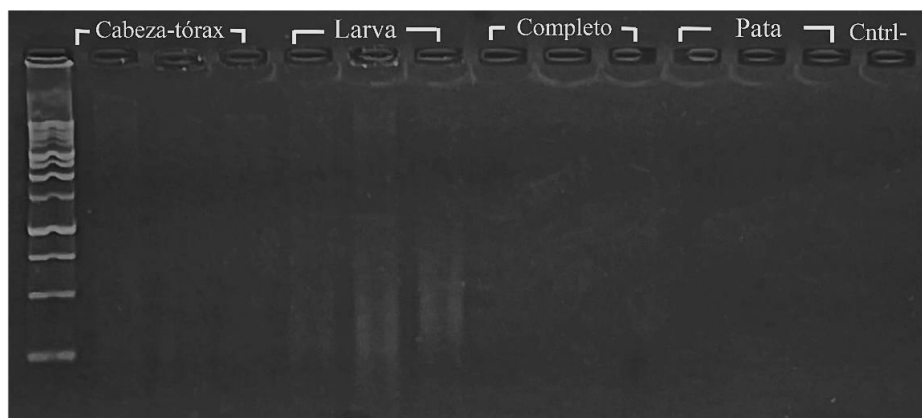


Tabla 1.

Promedio y desviación estándar de los cuatro experimentos realizados de extracción de ADN con el método CTAB.

	Tratamiento	Promedio de concentración (/ μl)	Promedio de absorbancia 260/280	Promedio de absorbancia 260/230
1	Cabeza-tórax	7.661 sd: 2.45	1.20 sd: 0.411	0.393 sd: 0.519
	Completo	24.594 sd: 5.55	1.24 sd: 0.329	1.08 sd: 0.429
	Larva	31.59 sd: 13.7	1.23 sd: 0.121	0.839 sd: 0.332
	Pata	0.376 sd: 0.49	0.019 sd: 0.033	0.018 sd: 0.023
2	Cabeza-tórax	30.58 sd:16.2	0.663 sd: 0.275	0.904 sd: 0.737
	Completo	50.985 sd:15.3	1.43 sd: 0.380	1.18 sd: 0.528
	Larva	56.488 sd: 20.1	1.358 sd: 0.352	1.312 sd: 0.396
	Pata	0.933 sd: 0.651	0.208 sd: 0.225	0.201 sd: 0.332
3	Cabeza-tórax	69.284 sd: 17.36	0.5933 sd: 0.371	0.393 sd: 0.519
	Completo	101.136 sd: 49.375	1.136 sd: 0.539	1.08 sd: 0.429
	Larva	333.890 sd: 34.05	1.320 sd: 0.115	0.839 sd: 0.332
	Pata	1.396 sd: 0.367	0.163 sd: 0.166	0.018 sd: 0.023
4	Cabeza-tórax	61.1653 sd:17.831	2.17 sd: 0.177	1.30 sd: 0.243
	Completo	95.829 sd:22.742	2.166 sd: 0.073	1.816 sd: 0.275
	Larva	412.660 sd: 45.991	2.253 sd: 0.049	2.235 sd: 0.285
	Pata	1.406	0.903	0.166

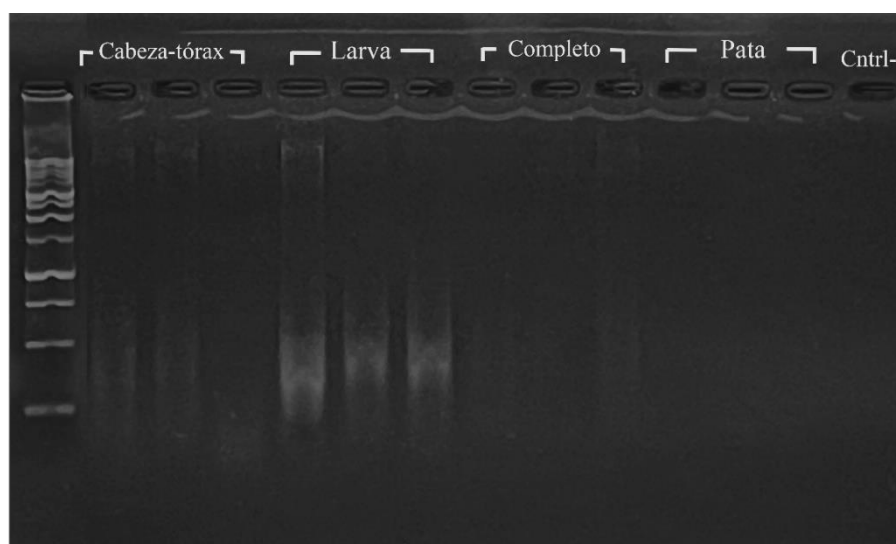
sd: 0.645

sd: 0.07

sd: 0.047

* Los números 1 a 4 corresponden a las extracciones de ADN realizadas con diferentes condiciones
 1: 1.5 hrs de incubación, 6 hrs de precipitación 1 hr de secado. 2: 1.5 hrs de incubación, 20 hrs de precipitación y 1 de secado. 3: 3 hrs de incubación, 20 hrs de precipitación y 1 de secado. 4: 3 hrs de incubación, 20 hrs de precipitación y 2 hrs de secado.

Figura 6. *Extracción de ADN con el método CTAB (Tiempo de incubación 3 hrs, 20 hrs de precipitación y 2 hr de secado). Marcador de peso molecular 1Kb. Los pozos corresponden a ADN extraído de 1-3 cabeza-tórax, 4-6 individuo completo, 7-9 pata, 10-12 larva y 13 control negativo.*

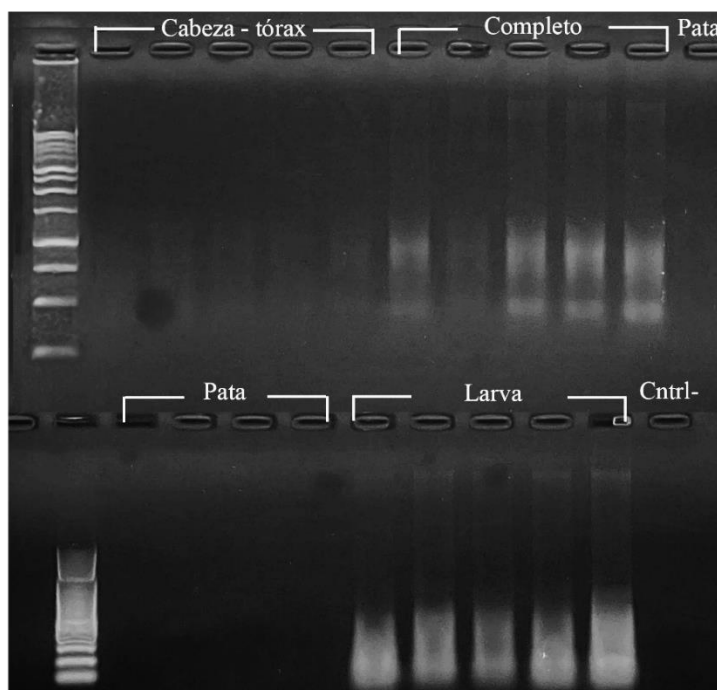


5.2. Protocolo estandarizado CTAB-PVP

A partir del protocolo de mayor eficiencia en la extracción (con el mayor tiempo de incubación, precipitación y secado), se obtuvo ADN de alto peso molecular desde los 10.000 pb hasta fragmentos más pequeños de 200 pb. Con el método CTAB-PVP, se observa una alta concentración de ADN en los tejidos larvales y en individuo completo (Figura 7). Por el contrario, para cabeza-tórax se ve una menor cantidad y en el caso de pata, aparenta ser ausente.

Figura 7.

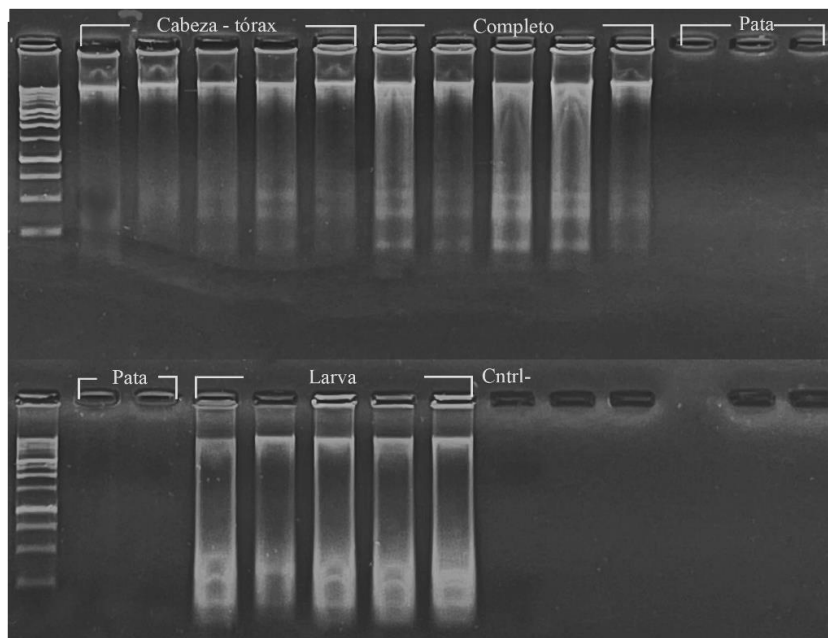
Visualización de extracciones de ADN con el método CTAB en un 1.2% gel de agarosa. Marcador de peso molecular 1Kb. 1-5 ADN extraído de cabeza-tórax, 6-10 ADN extraído de individuo completo, 11 control negativo, 12-16 ADN extraído de larva, 17- 21 ADN extraído de pata, 22 control negativo.

**5.3. ADN extraído con el kit DNeasy**

Lo observado con el kit DNeasy sigue un comportamiento similar a lo visto con el método CTAB, con la diferencia de que existe una mayor concentración de ADN cercano a los 10.000 pb en muestras como individuo completo y cabeza-tórax (Figura 8).

Figura 8.

Visualización de extracciones de ADN con el Kit DNeasy en un 1.2% gel de agarosa. Marcador de peso molecular 1Kb. 1-5 ADN extraído de cabeza-tórax, 6-10 ADN extraído de individuo completo, 11-15 ADN extraído de pata, 16-20 ADN extraído de larva, 21 control negativo.

**5.4. Cuantificación de ADN**

La cuantificación de ADN permitió determinar el promedio de la concentración y la pureza de los cuatro tratamientos evaluados, así como la desviación estándar en cada caso (Tabla 2). La mayor concentración de ADN por el método CTAB- PVP fue hallada para las muestras de larva (359.04 ng/ μ L), seguido por individuo completo (194.864 ng/ μ L), cabeza-tórax (45.051 ng/ μ L) y pata (2.5 ng/ μ L). En el caso de la extracción realizada con el kit DNeasy, se observó un patrón similar en el que la mayor concentración se obtuvo en los tejidos larvales (251.057 ng/ μ L), seguido por individuo completo (164.38 ng/ μ L), cabeza-tórax (79.004 ng/ μ L) y pata (14.292ng/ μ L).

Tabla 2.

Concentración de ADN y Absorbancia (260/280 y 260/230) en diferentes tejidos de mosca del mediterráneo (adulto completo, cabeza-tórax, pata y larvas) con dos métodos de ADN (DNeasy kit y CTAB).

Método	Tratamiento	Promedio de concentración	Promedio de absorbancia 260/280	Promedio de absorbancia 260/230
DNeasy	Cabeza-tórax	79.004 sd: 1.872	1.872 sd: 0.082	1.006 sd: 0.211
DNeasy	Completo	164.38 sd: 1.896	1.896 sd: 0.059	1.048 sd: 0.123
DNeasy	Larva	251.057 sd: 2.142	2.142 sd: 0.034	1.812 sd: 0.189
DNeasy	Pata	14.292 sd: 1.2	1.2 sd: 0.092	0.246 sd: 0.144
CTAB-PVP	Cabeza-tórax	45.051 sd:2.236	2.236 sd: 0.053	1.528 sd: 0.219
CTAB-PVP	Completo	194.864 sd:2.14	2.14 sd: 0.028	1.82 sd: 0.231
CTAB-PVP	Larva	359.04 sd:2.222	2.222 sd: 0.019	2.454 sd: 0.075
CTAB-PVP	Pata	2.501 sd: 0.83	0.83 sd: 0.101	0.15 sd: 0.049

Los valores de absorbancia obtenidos presentaron variaciones en los tratamientos y métodos utilizados. En el espectro 260/280 para el método CTAB-PVP las cifras de absorbancia se encontraron en un rango de 2.0 a 2.2 para muestras de cabeza-tórax, individuo completo y larva; para las muestras de pata fue menor a 1.8. Cuando se utilizó el kit DNeasy se obtuvo que las muestras de ADN de cabeza-tórax e individuo completo presentaron los valores de pureza en el

rango de 1.87 y 1.89 y larvas y pata tuvieron un promedio en el espectro mayor a 2.0 y menor a 1.8 respectivamente (Tabla 2).

En el espectro 260/230 para el método CTAB-PVP las cifras de absorbancia fueron mayores a 1.8 únicamente en el caso de individuo completo. En los demás tratamientos se encontró contaminación debido a valores bajos de absorbancia mayores a 2.0 y menores a 1.5. Para el kit DNeasy se obtuvo un promedio de 1.812 para las muestras de larva y para cabeza-tórax, individuo completo y pata se presentaron valores menores a 1.8 (Tabla 2).

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y los métodos utilizados con respecto a la concentración y la pureza del ADN. En el caso de la concentración, la variable más influyente fue los tratamientos ($\chi^2= 35.7$, gl = 3, $p < 0.01$), mientras que el método de extracción usado no es influyente en la cantidad de ADN obtenido ($\chi^2= 0.02641$, gl = 1, $p = 0.871$). Por medio del test de Wilcoxon se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos evaluados ($p < 0.01$) Por otra parte, la absorbancia a 260/280 y a 260/230 varió teniendo en cuenta los métodos de extracción (260/280 : $\chi^2= 4.117$, gl = 1, $p = 0.041$) (260/230 : $\chi^2= 5.417$, gl = 1, $p = 0.019$) y los tratamientos empleados (260/280 : $\chi^2= 25.4$, gl = 3, $p = 0.00012$) (260/230 : $\chi^2= 29.3$, gl = 3, $p = 0.000019$) por lo que la pureza de las muestras depende de la composición de los tejidos evaluados y los reactivos usados durante el aislamiento del ADN.

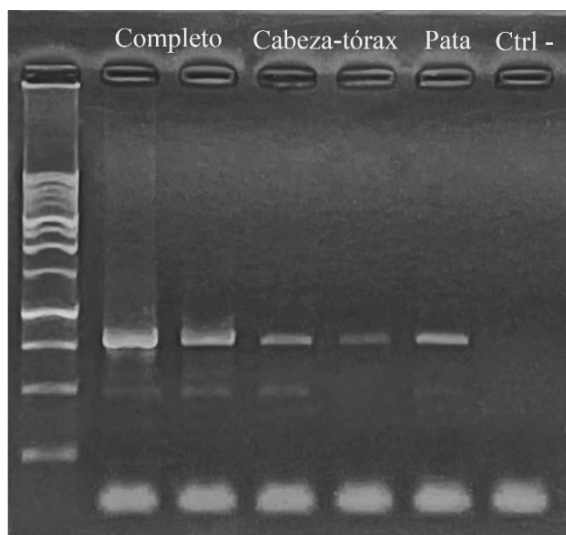
5.5. Amplificación del marcador molecular N5N4

Los protocolos de PCR implementados para las muestras de ADN permitieron la amplificación del marcador molecular N5N4. A partir del ADN aislado del método CTAB y el Kit DNeasy, se obtuvo el amplificado del marcador mitocondrial teniendo en cuenta condiciones específicas para tejidos como individuo adulto completo, cabeza-tórax pata y larva.

Inicialmente, se siguió para todos los tejidos y métodos de extracción el protocolo reportado por Ruíz et al., (2020) sin embargo, se obtuvieron amplificadores en sitios inespecíficos representados por una banda adicional de 500 pb (Figura 9).

Figura 9.

Amplificación del marcador molecular N5N4. Marcador de peso molecular de 1Kb. Los pozos 1 y 2 corresponden a muestras de ADN de individuo completo, 3 y 4 corresponden a cabeza-tórax, 5 corresponden a muestras de ADN de pata y 6 control negativo.



A partir de esto, se modificó la temperatura de alineamiento a 52°C y se redujo la cantidad de Mg^{2+} a la mitad, lo que permitió una disminución en la banda adicional y, por lo tanto, un único producto de 700 pb (Figura 10). Finalmente, se aumentó la especificidad de la PCR por medio de la disminución de la cantidad de ADN utilizado diluciones 1:100 (Figura 11).

Figura 10.

Amplificación del marcador molecular N5N4. Marcador de peso molecular de 1Kb. Las muestras corresponden a amplificadores de ADN extraído con los dos métodos con excepción de pata. Pozo

1(CTAB) y 2(Kit DNeasy): cabeza – tórax, Pozos 3 (CTAB) y 4 (Kit DNeasy): individuo completo y adicionalmente una muestra de pata de ADN extraído con el Kit DNeasy en pozo 5.

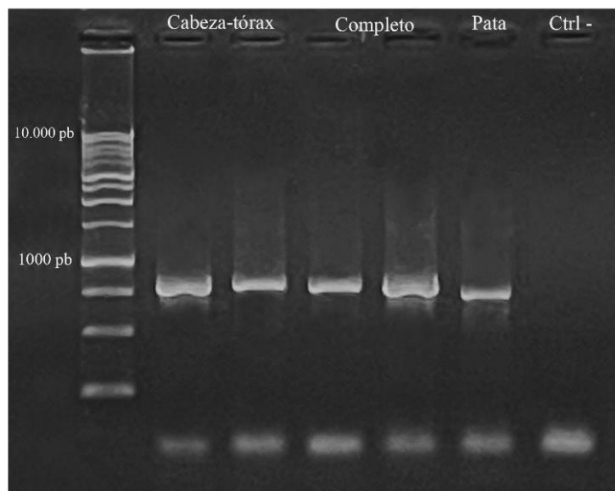
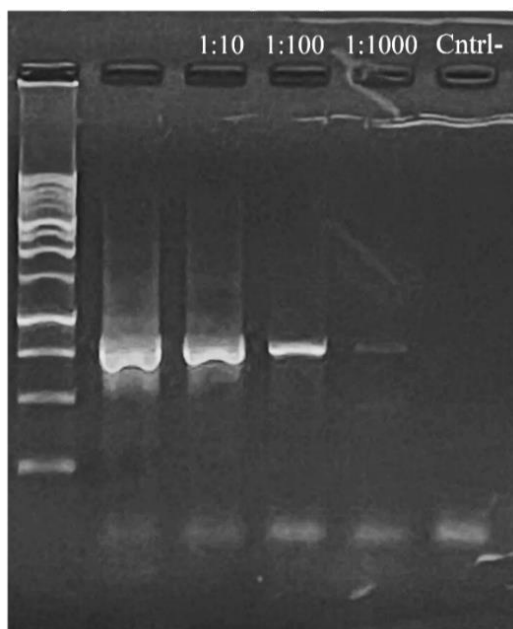


Figura 11.

Amplificación del marcador molecular N5N4 por medio de diluciones. Marcador de peso molecular de 1Kb. Las muestras corresponden a ADN extraído de individuo completo. El pozo 1 es ADN total, 2 dilución 1:10, 3 dilución 1:100, 4 dilución 1:1000, 5 control negativo.



Con las condiciones descritas anteriormente, se obtuvo el amplificado de los tejidos de ADN extraído por CTAB y el kit DNeasy de individuo completo (Figura 12) y cabeza-tórax (Figura 13).

Figura 12.

Amplificación del marcador molecular N5N4 de ADN de individuo completo. Marcador de peso molecular de 100 p. Los pozos 1-5 corresponden a ADN de extracciones con CTAB, mientras que del 6 al 10 corresponden a extracciones con el Kit DNeasy. El pozo 11 es el control negativo.

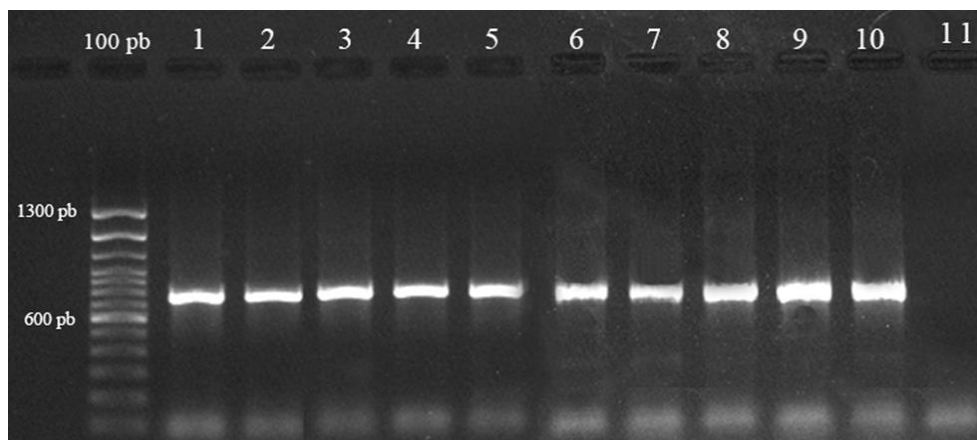


Figura 13.

Amplificación del marcador molecular N5N4 de ADN de cabeza – tórax. Marcador de peso molecular de 100 pb. Los pozos 1-5 corresponden a ADN de extracciones con CTAB, mientras que del 6 al 10 corresponden a extracciones con el Kit DNeasy. El pozo 11 es el control negativo.

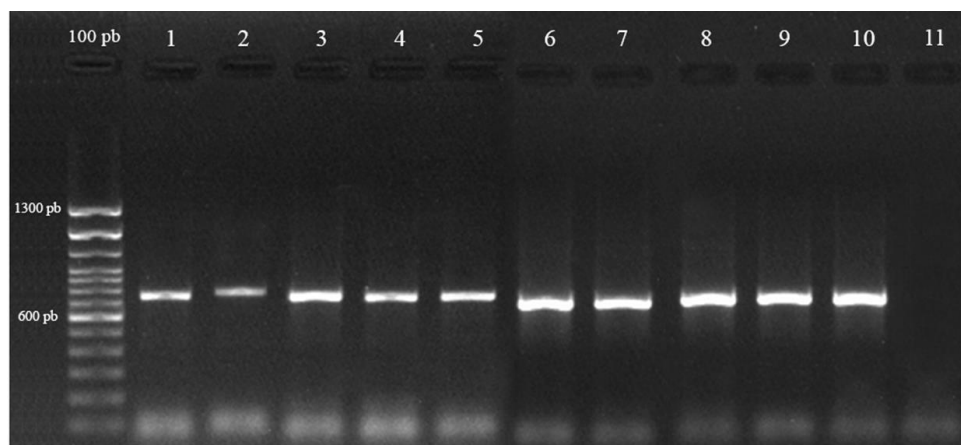
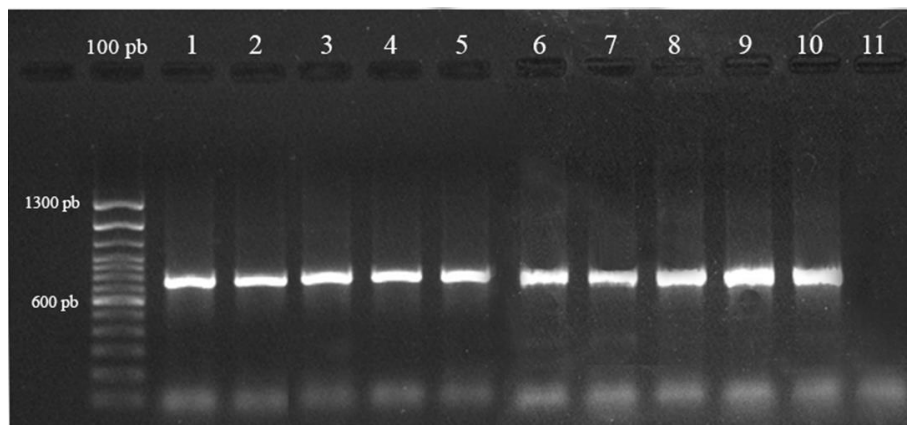


Figura 14.

Amplificación del marcador molecular N5N4 de ADN de larvas. Marcador de peso molecular de 100 pb. Los pozos 1-5 corresponden a ADN de extracciones con CTAB, mientras que del 6 al 10 corresponden a extracciones con el Kit DNeasy. El pozo 11 es el control negativo.



Con excepción de las diluciones de ADN, la amplificación del tejido de pata se realizó con las mismas condiciones que las descritas anteriormente para cabeza-tórax e individuo completo.

Sin embargo, con el ADN extraído con el método CTAB, cuando se utilizaron las condiciones mencionadas para adulto completo y cabeza-tórax, no se obtuvieron amplificadores. Por lo que se realizaron modificaciones como en la temperatura de alineamiento a 52°C, la mitad del Mg^{2+} (Figura 15) y 56°C con la cantidad normal de Mg^{2+} y a la mitad (Figura 16) sin obtener amplificadores consistentes. Finalmente se recurrió a la realización de diluciones 1:10 y 1:100 del ADN con lo cual no se obtuvo un resultado positivo (Figura 17), por esta razón, es necesaria la optimización posterior del protocolo de PCR para este tipo de muestras con este método de extracción.

No obstante, cuando se realizó la amplificación con tejido de pata extraído con el Kit DNeasy, utilizando las mismas condiciones empleadas para los tejidos de cabeza-tórax e individuo completo, no se obtuvieron amplificadores, pero al ajustar la temperatura de alineamiento a 52°C y el volumen de Mg^{2+} a la mitad, fue posible realizar la amplificación exitosa de ADN con tejido de pata con este método de extracción (Figura 18).

Figura 15.

Amplificación del marcador molecular N5N4 de ADN de pata por el método CTAB. Marcador de peso molecular de 100 pb. El pozo 6 corresponde al control negativo.

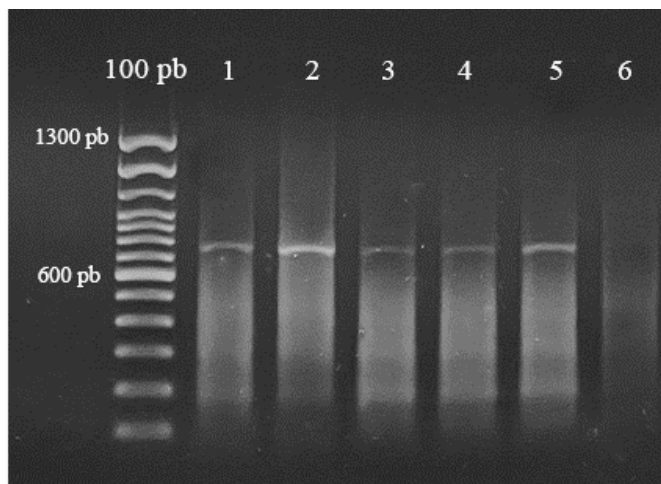
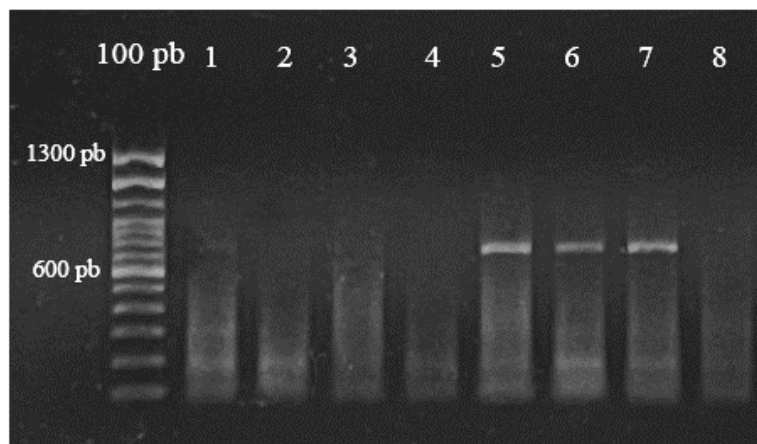


Figura 16.

Amplificación del marcador molecular N5N4 de ADN de pata por el método CTAB.

Marcador de peso molecular de 100 pb.

**Figura 17.**

Amplificación del marcador molecular N5N4 de ADN de pata por el método CTAB.

Marcador de peso molecular de 100 pb. Los pozos 1-5 corresponden a ADN diluido 1:10, mientras que del 6 al 10 corresponden a diluciones 1:100.

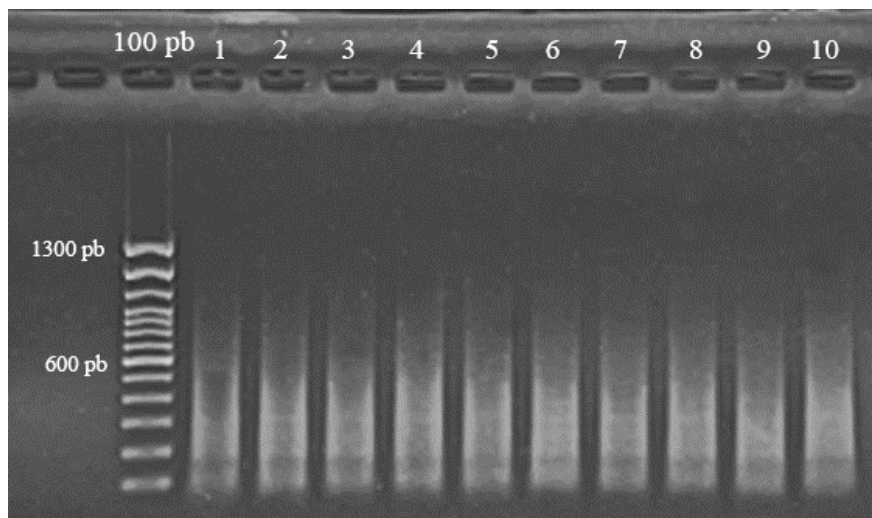
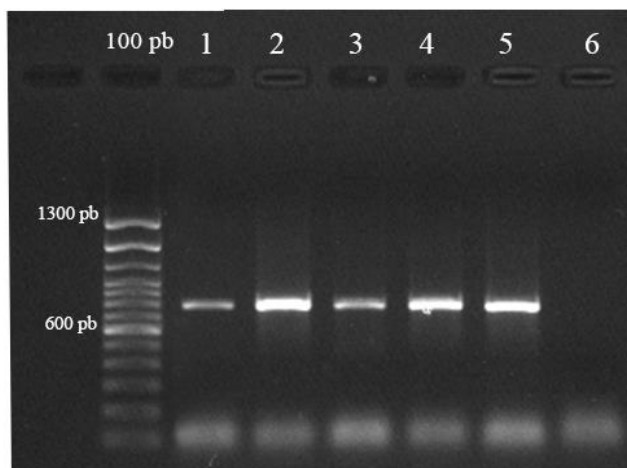


Figura 18.

Amplificación del marcador molecular N5N4 de ADN de pata extraído con el Kit DNeasy. Marcador de peso molecular de 100 pb. El pozo 6 corresponde al control negativo.



6. Discusión

En este estudio se llevó a cabo la evaluación de dos métodos de extracción de ADN y su efecto en la amplificación de un marcador molecular de *Ceratitis capitata* con muestras provenientes de Norte de Santander. Se realizó la extracción exitosa de ADN de cuatro tejidos diferentes de *C. capitata* (individuo adulto completo, cabeza-tórax, pata y larvas completas) con dos métodos de extracción de ADN, con excepción del ADN de pata extraído con el método CTAB. La concentración y pureza obtenida para los diferentes tejidos con los dos métodos de extracción utilizados presentó diferencias por lo cual fue necesario el ajuste de las condiciones de amplificación. En el caso del ADN de pata extraído con el método CTAB, condiciones como baja pureza pueden ser un factor relevante en el estudio de marcadores moleculares.

6.1. Concentración de ADN con los métodos de extracción

Los métodos de extracción de ADN se componen de procedimientos y reactivos que permiten el aislamiento y la purificación de muestras con diferentes características. El método CTAB emplea alcoholes, sales y detergentes que son eficientes en la extracción de muestras con un alto contenido en polisacáridos (Lefort & Douglas, 1999) por medio del aumento de su solubilidad en etanol (Calderón-Cortés et al., 2010). Aunque este método es comúnmente usado en tejidos de plantas, ha sido posible obtener ADN de alta calidad en muestras de insectos en los que CTAB se encarga de remover polisacáridos como la quitina (Calderón-Cortés et al., 2010). Este detergente se une al ADN de forma específica lo que permite una mayor eliminación de componentes celulares como proteínas, que pueden afectar la pureza de la muestra (Kouakou et al., 2022).

Sustancias químicas como el PVP pueden ser de ayuda en el proceso de purificación por medio de dos aspectos. En primer lugar, tiene la capacidad de unirse a proteínas y otros contaminantes haciéndolos insolubles y, por ende, permitiendo una mayor separación del ADN (Lefort & Douglas, 1999a). En segundo lugar, el PVP ha sido usado en insectos con un tipo de alimentación basada en frutos debido a que en el tracto digestivo de estos animales se puede encontrar un alto contenido en taninos y fenoles (Calderón-Cortés et al., 2010). Debido a que estos componentes son agentes oxidantes (Arruda et al., 2017), la calidad del ADN se puede ver afectada por los enlaces que se forman con el material genético afectando finalmente, la amplificación de marcadores.

La extracción de ADN reveló un patrón distintivo en cuanto a la concentración obtenida dependiendo del tejido empleado. Aunque es razonable que en las extracciones que utilizaron una mayor cantidad de muestra se obtuvo una mayor concentración de ADN, hubo casos en los cuales

el resultado fue diferente. Esto es evidente en el caso de las muestras de larva, donde la cuantificación arrojó valores dos veces superiores a los observados con respecto a tratamientos como adultos completos que, en comparación, representan una mayor cantidad de muestra. A partir de esto, se puede afirmar que la composición del tejido puede desempeñar un papel relevante en el aislamiento del material genético (Arseneau et al., 2017).

Teniendo en cuenta que las larvas tienen un tamaño y peso considerablemente menores en comparación con los adultos completamente desarrollados (Steck & Ekesi, 2015), es posible analizar este resultado desde dos perspectivas. En primer lugar, las larvas se encuentran en una etapa de constante actividad celular y síntesis de material genético, lo que aumenta la probabilidad de obtener una mayor cantidad de ADN debido al gran número de células en desarrollo (Huang et al., 2020). En segundo lugar, en el estadio larval los individuos carecen de un exoesqueleto recubierto de proteínas y polisacáridos, como la quitina, que les proporcionan rigidez y soporte estructural (Gomes et al., 2005). Por esta razón, el proceso de lisis durante la extracción puede ser mucho más efectivo en las larvas, ya que sus cuerpos son blandos y poseen tejidos con paredes celulares más susceptibles a la ruptura.

Otro ejemplo para evaluar la composición del tejido utilizado es el uso de muestras con una alta concentración de quitina y una baja concentración de ADN como las muestras de pata. La evaluación del método CTAB con respecto al Kit DNeasy permitió la comparación de la efectividad en el aislamiento de material genético de cada uno de los procedimientos (Chakraborty et al., 2020; Ožana et al., 2020). Debido al reducido tamaño del tejido utilizado, la concentración esperada para *C. capitata* es de 3 ng/ μ L (Barr, 2009), lo cual fue un valor cercano a lo obtenido con el método CTAB (2.5 ng/ μ L). Por otra parte, el desempeño del Kit DNeasy fue mucho mayor

teniendo en cuenta que se obtuvo valores cuatro veces mayores con un promedio de 14 ng/ μ L de ADN.

La alta efectividad del kit DNeasy para extraer ADN a partir muestras de tejido pequeñas, como tejidos de pata, puede relacionarse con los reactivos y los procedimientos del protocolo con el que está descrito. El uso de proteinasa K durante el proceso de lisis celular, resulta significativo debido a que su función endoproteasa permite el corte de puentes peptídicos presentes en muestras de ADN con polisacáridos y proteínas (Qamar et al., 2017) como las patas de *C. capitata*. Debido a que este es un tejido altamente quitinoso, el uso de un buffer adecuado acompañado de enzimas eficientes supone un proceso efectivo de lisis celular, lo que proporciona una mayor cantidad de ADN disponible.

Teniendo en cuenta la gran aceptación de la comunidad científica frente a métodos de extracción como el Kit DNeasy, es de vital importancia la comparación de este con métodos manuales (Wang et al., 2019). Gracias a su recurrente uso y a la confiabilidad de sus resultados, este kit se ha convertido en un estándar de referencia con el cual se pueden evaluar métodos como CTAB (Karsten et al., 2013) y así, encontrar diferencias significativas en términos de pureza, eficiencia y reproducibilidad.

La importancia de la aplicación de este tipo de protocolos, aunque radica en la necesidad de caracterizar las poblaciones de *C. capitata* en Colombia, tiene especial aplicación en su estudio de poblacional debido a que permite la conservación de especímenes casi intactos. Teniendo en cuenta que la mosca del mediterráneo es una plaga reconocida mundialmente, el registro de individuos en colecciones biológicas de las poblaciones bajo estudio es primordial en términos morfológicos y genéticos (Karsten et al., 2013).

6. 2. Pureza del ADN dependiendo del método de extracción

En este estudio, el método CTAB está modificado para la extracción de ADN de muestras con posibles concentraciones de polifenol, que en insectos como *C. capitata* pueden estar presentes en el tracto digestivo como producto de la ingesta de material vegetal (Singh et al., 2021). La presencia de polifenoles representa la aparición de un inhibidor de la amplificación de marcadores moleculares debido a la interacción que presentan dichas moléculas con los reactivos de la PCR (Rao & Doddamane, 2022). Además, la actividad de la enzima polimerasa puede verse afectada al punto de reducir su especificidad por medio de uniones imprecisas (Umekawa et al., 1999). Por esta razón el uso de PVP en las extracciones de ADN es primordial, debido a que cumple la función de captar el polifenol uniéndose y precipitando sus moléculas para liberar la muestra de agentes contaminantes.

Teniendo en cuenta los valores referencia de pureza, la menor contaminación se obtuvo por medio del kit DNeasy. Debido a que el método CTAB requiere de numerosos pasos en los que se utilizan reactivos de diferentes naturalezas, es posible que durante el procedimiento las muestras de ADN retengan residuos e impurezas (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

Un caso especial son las muestras de pata donde se obtuvo los valores más bajos de pureza ($260/280 = 0.83$ y $260/230 = 0.15$) para CTAB, lo que puede ser una explicación a la falta de amplificación de la región N5N4. Teniendo en cuenta estudios previos, es posible que la proporción de los reactivos usados pueda incrementar los efectos de la contaminación presente en el ADN cuando se utiliza una reducida muestra de tejido (Mandrioli, 2008; Miura et al., 2017; Nakahama et al., 2019). Por este motivo es necesario, en investigaciones posteriores, la implementación de estrategias que permitan una mayor calidad del ADN para la correcta amplificación del marcador mitocondrial N5N4. Por otra parte, los procedimientos realizados con

el kit DNeasy llevan a cabo una purificación más rigurosa por medio de tecnologías como las columnas de sílice, que aprovechan las interacciones químicas y electrostáticas entre el ADN y la superficie de sílice (Wong et al., 2020). A partir de esto, los kits comerciales pueden presentar una mayor consistencia en sus muestras en cuanto a la eliminación de sustancias diferentes al material genético.

6.3. Inhibidores de la PCR

En el proceso de amplificación de un marcador molecular, existe un gran número de variables que condicionan la efectividad y éxito de este. Una de las más influyentes es la presencia de inhibidores que pueden provenir de los reactivos utilizados en el aislamiento de ADN o de las muestras en si (Schrader et al., 2012). En este estudio, los protocolos implementados se llevaron a cabo teniendo en cuenta modificaciones en las concentraciones de Mg^{2+} , el aumento en la temperatura de alineamiento y la dilución de las muestras de ADN para disminuir el efecto de los inhibidores presentes.

En insectos como *C. capitata*, existe la presencia de un exoesqueleto rico en compuestos químicos (Senne et al., 2022), polisacáridos (Demeke & Adams, 1992) y pigmentos (Boncristiani et al., 2011) que actúan como inhibidores que interfieren en la actividad de la polimerasa. Una solución encontrada para el manejo de estas sustancias fue la disminución a la mitad de la concentración de $MgCl_2$ (Opel et al., 2010). Aunque el Mg^{2+} es un cofactor relevante para la actividad de la *Taq* polimerasa, la presencia de inhibidores en las muestras puede resultar en la formación de complejos insolubles entre el Mg^{2+} y los inhibidores, lo que afecta la disponibilidad de iones (Schrader et al., 2012). Por medio de la reducción en la cantidad disponible de este

compuesto, es posible la disminución del efecto inhibitorio de las impurezas presentes y, por ende, el aumento de la efectividad de la amplificación.

Adicionalmente, la especificidad en la PCR fue alcanzada por medio de la modificación en las condiciones de alineamiento con respecto a Ruiz et al., (2020). El aumento de la temperatura de hibridación puede implicar el cambio en las características de las moléculas presentes. En primer lugar, la *Taq* polimerasa se ve restringida a una mayor especificidad en la adhesión a sitios de replicación por lo cual hay una menor probabilidad de amplificación de fragmentos no deseados (Porta & Enners, 2012). Por otra parte, en muestras con presencia de impurezas, la temperatura puede ser un factor relevante en la interacción entre estas moléculas con respecto a los reactivos de la PCR (Schrader et al., 2012).

Como una tercera herramienta para la amplificación, fueron realizadas diluciones 1:100 en los tejidos de individuo completo y cabeza - tórax. Teniendo en cuenta que la concentración de ADN en las muestras de larvas fue mucho mayor y que en esos casos no fue necesario realizar diluciones, se puede afirmar que la presencia de polisacáridos como la quitina son el factor determinante de la efectividad de la amplificación. Los tejidos de individuo completo y cabeza – tórax, corresponden a un estadio de desarrollo adulto del individuo en el que la cantidad de sustancias contaminantes son mayores (Finke, 2007) y los métodos de extracción de ADN convencionales no permiten su desecho. Las muestras de pata corresponden a un tejido proveniente de individuos adultos y, aunque también presentan una gran cantidad de quitina, las extracciones de ADN solo aíslan una pequeña cantidad de material genético por lo cual no fue necesaria su dilución.

A través de la implementación de protocolos de amplificación efectivos, fue posible el uso de muestras de ADN con diferentes condiciones de concentración y pureza. Con base en esto, el estudio molecular de *Ceratitis capitata*, podrá ser realizado

6. Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que los dos métodos implementados son efectivos para la extracción de ADN de *C. capitata* en diferentes tejidos del insecto (adulto completo, cabeza-tórax, pata y estadio larval completo), siendo el método CTAB más adecuado para obtener mayor cantidad de ADN, mientras que el kit DNeasy permite una menor contaminación.

Igualmente, los dos métodos evaluados permitieron obtener producto PCR adecuado para la secuenciación del marcador mitocondrial N4N5 con ADN proveniente de los diferentes tejidos del insecto con ambos métodos de extracción de ADN. No obstante, en el caso de la amplificación con tejido de pata utilizando el método CTAB se requiere una mayor optimización del protocolo.

Aunque en el caso del Kit DNeasy es posible la obtención de muestras con una alta pureza, por lo cual su uso puede permitir la amplificación de cualquier tejido empleado, este método presenta limitaciones de ser necesario el procesamiento de numerosas muestras debido a su alto costo. En contraste, el método CTAB es una solución de bajo costo que, aunque requiere un mayor esfuerzo en laboratorio y no permite los mismos niveles de pureza del ADN, es altamente efectivo para la amplificación del marcador N5N4.

Por medio del presente estudio, se desarrolló la estandarización de un protocolo de extracción de ADN efectivo y de bajo costo y, posteriormente, la amplificación de un marcador molecular mitocondrial (N5N4) ampliamente reportado para *C. capitata*. A través, del protocolo

estandarizado es posible la identificación molecular de la especie en estadio larval y adulto, así como de tejidos como pata, que permiten la preservación de individuos para colecciones biológicas. A partir de esta información, se plantea la base del estudio molecular y la identificación de poblaciones de *C. capitata* en Colombia.

El estudio realizado es el punto de partida para la caracterización de poblaciones de *C. capitata*, así como procesos relevantes vistos en otras partes del mundo como los complejos de especies crípticas (De Meyer et al., 2015). Desde este enfoque, la comprensión de la diversidad genética y evolutiva de *C. capitata*, permitirá la implementación de estrategias de control más precisas y eficientes en Colombia.

7. Recomendaciones

Para futuras investigaciones, se plantea el uso del protocolo de extracción de ADN y amplificación para *Certatitits capitata* aquí descrito con el fin de investigar su estado actual en Colombia. Por medio de la identificación y reconocimiento de las poblaciones de la mosca del mediterráneo, será posible el manejo de la especie, así como los pasos siguientes en pro de su erradicación. Además, de ser necesario, se recomienda el mejoramiento del protocolo aquí descrito para la extracción de ADN de muestras de pata por medio del método CTAB con el fin de obtener aislados genéticos con una mayor calidad, conservando la integridad de los ejemplares.

Referencias Bibliográficas

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Aboul-Maaty, N. A.-F., & Oraby, H. A.-S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Abrol, D. P., & Shankar, U. (2015). Pesticides, food safety and integrated pest management. En *Integrated Pest Management* (pp. 167–199). Springer Netherlands
- Alcantara, D. M. C., Graciolli, G., & Nihei, S. S. (2019). Revision of *Noctiliostrebla* (Diptera: Streblidae), parasites of bulldog bats (Chiroptera: Noctilionidae: *Noctilio*). *Zootaxa*, 4560(3), zootaxa.4560.3.4. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4560.3.4>
- Andrews, K. J., Bester, R., Manrakhan, A., & Maree, H. J. (2022). A multiplex PCR assay for the identification of fruit flies (Diptera: Tephritidae) of economic importance in South Africa. *Scientific Reports*, 12(1), 13089. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17382->
- Arias, M. B., Elfekih, S., & Vogler, A. P. (2018). Population genetics and migration pathways of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* inferred with coalescent methods. *PeerJ*, 6(e5340), e5340. <https://doi.org/10.7717/peerj.5340>

- Arruda, S. R., Pereira, D. G., Silva-Castro, M. M., Brito, M. G., & Waldschmidt, A. M. (2017). Research Article An optimized protocol for DNA extraction in plants with a high content of secondary metabolites, based on leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). *Genetics and molecular research: GMR*, 16(3). <https://doi.org/10.4238/gmr16039063>
- Adler, P. H., Cheke, R. A., & Post, R. J. (2010). Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 10(7), 846–865. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.003>
- Afia, Y. (2018). Seasonal abundance of peach fruit fly (PFF), *Bactrocera zonata* saund., and Mediterranean fruit fly (MFF), *Ceratitidis capitata* Wied., (Tephritidae - Diptera) on varieties of different grapes, in Giza gov. Egypt. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 9(10), 683–689. <https://doi.org/10.21608/jppp.2018.43958>
- Arseneau, J.-R., Steeves, R., & Laflamme, M. (2017). Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. *Molecular Ecology Resources*, 17(4), 686–693. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12616>
- Asokan, R., Rebijith, K. B., Singh, S. K., Sidhu, A. S., Siddharthan, S., Karanth, P. K., Ellango, R., & Ramamurthy, V. V. (2011). Molecular identification and phylogeny of *Bactrocera* Species (Diptera: Tephritidae). *The Florida Entomologist*, 94(4), 1026–1035. <https://doi.org/10.1653/024.094.0441>

- Badii, K. B., Billah, M. K., Afreh Nuamah, K., Obeng Ofori, D., & Nyarko, G. (2015). Review of the pest status, economic impact, and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. *African journal of agricultural research*, *10*(12), 1488–1498. <https://doi.org/10.5897/ajar2014.9278>
- Barr, N. B., Islam, M. S., De Meyer, M., & McPheron, B. A. (2012). Molecular Identification of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) using DNA Sequences of the COI Barcode Region. *Annals of the Entomological Society of America*, *105*(2), 339–350. <https://doi.org/10.1603/an11100>
- Barr, Norman B. (2009). Pathway analysis of *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) using mitochondrial DNA. *Journal of Economic Entomology*, *102*(1), 401–411. <https://doi.org/10.1603/029.102.0153>
- Boncristiani, H., Li, J., Evans, J. D., Pettis, J., & Chen, Y. (2011). Scientific note on PCR inhibitors in the compound eyes of honeybees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, *42*(4), 457–460. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0009-9>
- Calabria, G., Máca, J., Bächli, G., Serra, L., & Pascual, M. (2012). First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe: First record of *Drosophila suzukii* in Europe. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie. Journal of Applied Entomology*, *136*(1–2), 139–147. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01583.x>

- Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Cano-Camacho, H., & Zavala-Páramo, G. (2010). A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(12), 5056–5064. <https://doi.org/10.3390/ijms11125056>
- Cappelli, A., Petrelli, D., Gasperi, G., Serrao, A. G. M., Ricci, I., Damiani, C., & Favia, G. (2022). Bacterial symbionts in *Ceratitidis capitata*. *Insects*, *13*(5), 474. <https://doi.org/10.3390/insects13050474>
- Casey, D. G., & Burnell, A. M. (2002). The isolation of microsatellite loci in the Mediterranean fruitfly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) using a biotin/streptavidin enrichment technique: PRIMER NOTE. *Molecular ecology notes*, *1*(3), 120–122. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00038.x>
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S. Y., Wang, H., & Siegfried, B. D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PloS One*, *5*(8), e11963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Convey, P., & Block, W. (2013). Antarctic diptera: Ecology, physiology, and distribution. *European Journal of Entomology*, *93*(1), 1–13. https://www.eje.cz/artkey/eje-199601-0001_Antarctic_diptera_Ecology_physiology_and_distribution.php
- Costa, A. M., Amorim, F. de O., Anjos-Duarte, C. S., & Joachim-Bravo, I. S. (2011). Influence of different tropical fruits on biological and behavioral aspects of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera, Tephritidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, *55*(3), 355–360. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262011005000039>

- Coupland, J. B., & Barker, G. M. (2004). Diptera as predators and parasitoids of terrestrial gastropods, with emphasis on Phoridae, Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae and Fanniidae. En *Natural enemies of terrestrial molluscs* (pp. 85–158). CABI Publishing.
- Chakraborty, S., Saha, A., & Neelavar Ananthram, A. (2020). Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits? *Biotech*, *10*(2), 69. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2051-7>
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S. Y., Wang, H., & Siegfried, B. D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PloS One*, *5*(8), e11963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Conpes. 2008. Política Nacional fitosanitaria y de inocuidad para las cadenas de frutas y otros vegetales. Consejo Nacional de Política Económica y Social República de Colombia. p 45.
- de Aquino, J. C., & Joachim-Bravo, I. S. (2014). Relevance of male size to female mate choice in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Investigations with wild and laboratory-reared flies. *Journal of Insect Behavior*, *27*(2), 162–176. <https://doi.org/10.1007/s10905-013-9410-8>
- De Meyer, M., Delatte, H., Ekesi, S., Jordaens, K., Kalinová, B., Manrakhan, A., Mwatawala, M., Steck, G., Van Cann, J., Vaníčková, L., Břízová, R., & Virgilio, M. (2015). An integrative approach to unravel the *Ceratitis* FAR (Diptera, Tephritidae) cryptic species complex: a review. *ZooKeys*, *540*(540), 405–427.

- Demeke, T., & Adams, R. P. (1992). The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques*, *12*(3), 332–334.
- Drosopoulou, E., Pantelidou, C., Gariou-Papalexiou, A., Augustinos, A. A., Chartomatsidou, T., Kyritsis, G. A., Bourtzis, K., Mavragani-Tsipidou, P., & Zacharopoulou, A. (2017). The chromosomes and the mitogenome of *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae): two genetic approaches towards the *Ceratitis* FAR species complex resolution. *Scientific Reports*, *7*(1), 4877. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05132-3>
- Dermauw, W., Van Moerkercke, Y., Ebrahimi, N., Casteels, H., Bonte, J., & Witters, J. (2022). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of *Ceratitis capitata* and related species. *Current Research in Insect Science*, *2*(100029), 100029. <https://doi.org/10.1016/j.cris.2022.100029>
- Doyle, J & Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*, 13-15.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M.-A., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Parnell, S., Potting, R., Reignault, P. L., Thulke, H.-H., Van der Werf, W., Vicent Civera, A., Yuen, J., Zappalà, L., ... MacLeod, A. (2020). Pest categorisation of non-EU Tephritidae. *EFSA journal*, *18*(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5931>
- Elmes, G. W., Barr, B., Thomas, J. A., & Clarke, R. T. (1999). Extreme host specificity by *Microdon mutabilis* (Diptera: Syrphidae), a social parasite of ants. *Proceedings. Biological Sciences*, *266*(1418), 447–453. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0658>

- Elfékih, S., Makni, M., & Haymer, D. S. (2010). Genetic Diversity of ND5 mitochondrial patterns in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) populations from Tunisia. *Annales de La Societe Entomologique de France. Societe Entomologique de France*, 46(3–4), 464–470. <https://doi.org/10.1080/00379271.2010.10697682>
- EPPO, 2011. European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Ceratitis capitata*. Bulletin 41. 340-346.
- Finke, M. D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26(2), 105–115. <https://doi.org/10.1002/zoo.20123>
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541–4550. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04380.x>
- Gasparich, G. E., Sheppard, W. S., Han, H. Y., McPheron, B. A., & Steck, G. J. (1995). Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. *Insect Molecular Biology*, 4(1), 61–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1995.tb00008.x>
- Gomes, C. E. M., Barbosa, A. E. A. D., Macedo, L. L. P., Pitanga, J. C. M., Moura, F. T., Oliveira, A. S., Moura, R. M., Queiroz, A. F. S., Macedo, F. P., Andrade, L. B. S., Vidal, M. S., & Sales, M. P. (2005). Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). *Plant*

Physiology and Biochemistry, 43(12), 1095–1102.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.11.004>

Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 411–422. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.3.411>

Ha, L. T. V., Vanlerberghe, L., Toan, H. T., Dewettinck, K., & Messens, K. (2015). Comparative evaluation of six extraction methods for DNA quantification and PCR detection in cocoa and cocoa-derived products. *Food Biotechnology*, 29(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1080/08905436.2014.996761>

Harris, E. J., Nakagawa, S., & Urago, T. (1971). Sticky traps for detection and survey of three Tephritids. *Journal of Economic Entomology*, 64(1), 62–65.
<https://doi.org/10.1093/jee/64.1.62>

Haymer, D. S., Tanak, T., & Teramae, C. (1994). DNA probes can be used to discriminate between tephritid species at all stages of the life cycle (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 87(3), 741–746. <https://doi.org/10.1093/jee/87.3.741>

Harrington, L. C., Edman, J. D., & Scott, T. W. (2001). Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *Journal of Medical Entomology*, 38(3), 411–422. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.3.411>

- Hernandez, M., Vargas-Arispuro, I., Sanz, I., Adelantado, M., & Primo-Yufera, E. (1999). Electroantennogram activity and attraction assay of *Ceratitis capitata* to airborne volatiles from peach at three ripeness stages. *Southwestern Entomologist*, *24*, 133–142.
- Huang, Y., Gu, X., Peng, X., Tao, M., Chen, G., & Zhang, X. (2020). Effect of short-term high-temperatures on the growth, development and reproduction in the fruit fly, *Bactrocera tau* (Diptera: Tephritidae). *Scientific Reports*, *10*(1), 6418. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63502-w>
- Instituto Colombiano Agropecuario-ICA (2019). RESOLUCIÓN No. 995 (04/02/2019) “Por la cual se establecen medidas fitosanitarias para el control de las moscas de la fruta en el territorio nacional y se dictan otras disposiciones”.
- Kang, D., & Hamasaki, N. (2002). Maintenance of mitochondrial DNA integrity: repair and degradation. *Current Genetics*, *41*(5), 311–322. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0312-0>
- Karsten, M., van Vuuren, B. J., Barnaud, A., & Terblanche, J. S. (2013). Population genetics of *Ceratitis capitata* in South Africa: Implications for dispersal and pest management. *PLoS One*, *8*(1), e54281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054281>
- Knipling, E. F. (1959). Sterile-Male Method of Population Control: Successful with some insects, the method may also be effective when applied to other noxious animals. *Science (New York, N.Y.)*, *130*(3380), 902–904. <https://doi.org/10.1126/science.130.3380.902>

Konstantopoulou, M. A., & Mazomenos, B. E. (2005). Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. *BioControl (Dordrecht, Netherlands)*, *50*(2), 293–305.

<https://doi.org/10.1007/s10526-004-0458-4>

Kouakou, J.-L., Gonedelé-Bi, S., Assamoi, J.-B., & Assanvo N’Guetta, S.-P. (2022). Optimization of the Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) DNA extraction protocol using forest elephant dung samples. *MethodsX*, *9*(101867), 101867.

<https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101867>

Lefort, F., & Douglas, G. C. (1999a). An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annales Des Sciences Forestières*, *56*(3), 259–263. <https://doi.org/10.1051/forest:19990308>

Linton, Y.-M., Harbach, R. E., Seng, C. M., Anthony, T. G., & Matusop, A. (2001). Morphological and molecular identity of *Anopheles* (*Cellia*) *sundaicus* (Diptera: Culicidae), the nominotypical member of a malaria vector species complex in Southeast Asia: *Anopheles sunndaicus* s.s. *Systematic Entomology*, *26*(3), 357–366. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.2001.00153.x>

Liquido NJ, McQuate GT, Suiter KA. (2014) MEDHOST: An encyclopedic bibliography of the host plants of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), Version 2.0. United States Department of Agriculture, Center for Plant Health Science and Technology, Raleigh. <https://medhostv2.cphst.org/>

- Malacrida, A. R., Guglielmino, C. R., D'Adamo, P., Torti, C., Marinoni, F., & Gasperi, G. (1996). Allozyme divergence and phylogenetic relationships among species of tephritid flies. *Heredity*, *76*(6), 592–602. <https://doi.org/10.1038/hdy.1996.85>
- Malacrida, A. R., Gomulski, L. M., Bonizzoni, M., Bertin, S., Gasperi, G., & Guglielmino, C. R. (2007). Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. *Genetica*, *131*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9117-2>
- Mandrioli, M. (2008). Insect collections and DNA analyses: how to manage collections? *Museum Management and Curatorship*, *23*(2), 193–199. <https://doi.org/10.1080/09647770802012375>
- Margam, V. M., Gachomo, E. W., Shukle, J. H., Ariyo, O. O., Seufferheld, M. J., & Kotchoni, S. O. (2010). A simplified arthropod genomic-DNA extraction protocol for polymerase chain reaction (PCR)-based specimen identification through barcoding. *Molecular Biology Reports*, *37*(7), 3631–3635. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0014-5>
- Miura, K., Higashiura, Y., & Maeto, K. (2017). Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects. *Applied Entomology and Zoology*, *52*(2), 349–352. <https://doi.org/10.1007/s13355-017-0481-4>
- Moussian, B., Schwarz, H., Bartoszewski, S., & Nüsslein-Volhard, C. (2005). Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*: Chitin Organizes Cuticle Morphology. *Journal of Morphology*, *264*(1), 117–130. <https://doi.org/10.1002/jmor.10324>

Nakahama, N., Isagi, Y., & Ito, M. (2019). Methods for retaining well-preserved DNA with dried specimens of insects. *European journal of entomology*, *116*, 486–491.

<https://doi.org/10.14411/eje.2019.050>

Noman, M. S., Liu, L., Bai, Z., & Li, Z. (2020). Tephritidae bacterial symbionts: potentials for pest management. *Bulletin of Entomological Research*, *110*(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1017/S0007485319000403>

Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R. (2010). A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences*, *55*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>

Ožana, S., Pyszko, P., & Dolný, A. (2020). Determination of suitable insect part for non-lethal DNA sampling: case study of DNA quality and regeneration capability of dragonflies. *Insect Conservation and Diversity*, *13*(4), 319–327.

<https://doi.org/10.1111/icad.12400>

Porta, A. R., & Enners, E. (2012). Determining annealing temperatures for polymerase chain reaction. *The American Biology Teacher*, *74*(4), 256–260.

<https://doi.org/10.1525/abt.2012.74.4.9>

Potamitis, I., Rigakis, I., & Tatlas, N.-A. (2017). Automated surveillance of fruit flies. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *17*(1). <https://doi.org/10.3390/s17010110>

Paquette, S. R., Garant, D., Pelletier, F., & Bélisle, M. (2013). Seasonal patterns in tree swallow prey (Diptera) abundance are affected by agricultural intensification. *Ecological*

- Applications: A Publication of the Ecological Society of America, 23(1), 122–133.
<https://doi.org/10.1890/12-0068.1>
- Rabossi, A., Wappner, P., & Quesada- Allué, L. A. (1992). Larva to pharate adult transformation in the medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *The Canadian Entomologist*, 124(6), 1139–1147. <https://doi.org/10.4039/ent1241139-6>
- Qamar, W., Khan, M. R., & Arafah, A. (2017). Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-proteinase K method. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(7), 1465–1469. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.016>
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rajabiyan, M., Shayanmehr, M., & Mohammadi Sharif, M. (2015). The Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) in Iran: genetic diversity and comparison with other countries. *Journal of entomological and acarological research*, 47(1), 20.
<https://doi.org/10.4081/jear.2015.4055>
- Rao, K. V., & Doddamane, M. (2022). A method for isolation of DNA from Polyphagous Insects by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB-PVPP method). *Journal of entomology and zoology studies*, 10(6), 117–120. <https://doi.org/10.22271/j.ento.2022.v10.i6b.9099>

- Ruiz-Arce, R., Todd, T. N., Deleon, R., Barr, N. B., Virgilio, M., De Meyer, M., & McPheron, B. A. (2020). Worldwide Phylogeography of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Using Mitochondrial DNA. *Journal of Economic Entomology*, *113*(3), 1455–1470. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa024>
- Santiago-Alarcon, D., Palinauskas, V., & Schaefer, H. M. (2012). Diptera vectors of avian Haemosporidian parasites: untangling parasite life cycles and their taxonomy. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *87*(4), 928–964. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00234.x>
- Sawin, E. P., Harris, 1. Laurence R., Campos, 2. Ana R., & Sokoiewski, M. B. (1994). Sensorimotor Transformation from Light Reception to Phototactic Behavior in *Drosophila* Larvae (Diptera: Drosophilidae). Utoronto.ca. <http://sokolowski.eeb.utoronto.ca/files/2012/07/Sensorimotor-transformation-from-light-reception-to-phototactic-behavior-in-Drosophila-larvae.-1994.pdf>
- Singh, S. K., Kumar, D., & Ramamurthy, V. V. (2010). Biology of *Bactrocera* (Zeugodacus) *tau* (Walker) (Diptera: Tephritidae): Biology of *Bactrocera tau*. *Entomological Research*, *40*(5), 259–263. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2010.00296.x>
- Skevington, J. H., & Dang, P. T. (2002). Exploring the diversity of flies (Diptera). *Biodiversity* (Nepean, Ont.), *3*(4), 3–27. <https://doi.org/10.1080/14888386.2002.9712613>

- Sukontason, K. L., Sanit, S., Klong-Klaew, T., Tomberlin, J. K., & Sukontason, K. (2014). *Sarcophaga (Liosarcophaga) dux* (Diptera: Sarcophagidae): A flesh fly species of medical importance. *Biological Research*, 47(1), 14. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-14>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Singh, S., Kaur, I., & Kariyat, R. (2021). The multifunctional roles of polyphenols in plant-herbivore interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1442. <https://doi.org/10.3390/ijms22031442>
- Senne, N. A., Santos, H. A., Araújo, T. R., Paulino, P. G., Mendonça, L. P., Moreira, H. V. S., Camilo, T. A., & da Costa Angelo, I. (2022). Robust comparative performance of genomic DNA extraction methods from non-engorged phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 36(2), 203–211. <https://doi.org/10.1111/mve.12567>
- Solari, P., Corda, V., Sollai, G., Kreissl, S., Galizia, C. G., & Crnjar, R. (2016). Morphological characterization of the antennal lobes in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 202(2), 131–146. <https://doi.org/10.1007/s00359-015-1059-7>
- Ssymank, A., Kearns, C. A., Pape, T., & Thompson, F. C. (2008). Pollinating Flies (Diptera): A major contribution to plant diversity and agricultural production. *Biodiversity (Nepean, Ont.)*, 9(1–2), 86–89. <https://doi.org/10.1080/14888386.2008.9712892>

- Steck, G. J., & Ekesi, S. (2015). Description of third instar larvae of *Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa* (FAR complex) and *C. capitata* (Diptera, Tephritidae). *ZooKeys*, 540(540), 443–466. <https://doi.org/10.3897/zookeys.540.10061>
- Tabilio, M. R., Fiorini, D., Marcantoni, E., Materazzi, S., Delfini, M., De Salvador, F. R., & Musmeci, S. (2013). Impact of the Mediterranean fruit fly (medfly) *Ceratitis capitata* on different peach cultivars: the possible role of peach volatile compounds. *Food Chemistry*, 140(1–2), 375–381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.074>
- Umekawa, H., Takada, Y., Furuichi, Y., Takahashi, T., Achiwa, Y., Komiya, T., & Yoshida, S. (1999). Inhibition of eukaryotic DNA polymerase α by persimmon (*Diospyros kaki*) extract and related polyphenols. *IUBMB life*, 47(5), 795–801. <https://doi.org/10.1080/15216549900201883>
- Vargas, J. (2014). *Canales y márgenes de comercialización de los productos apícolas en la Provincia Centro (Departamento de Boyacá)*. Universidad Nacional de Colombia.
- Velásquez, Y., Magaña, C., Martínez-Sánchez, A., & Rojo, S. (2010). Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(3), 293–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00879.x>
- Virgilio, M., Backeljau, T., Emeleme, R., Juakali, J. L., & De Meyer, M. (2011). A quantitative comparison of frugivorous tephritids (Diptera: Tephritidae) in tropical forests and rural areas of the Democratic Republic of Congo. *Bulletin of Entomological Research*, 101(5), 591–597. <https://doi.org/10.1017/S0007485311000216>

- Vasconcelos, S. D., & Araujo, M. C. S. (2012). Necrophagous species of Diptera and Coleoptera in northeastern Brazil: state of the art and challenges for the Forensic Entomologist. *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(1), 7–14. <https://doi.org/10.1590/s0085-56262012005000014>
- Villamizar Antonilez, E. (2016). El durazno: un proceso de cambio en la agricultura de la provincia de pamplona. *Face*, 2008(7), 64. <https://doi.org/10.24054/01204211.v7.n7.2008.1972>
- Weldon, C. W., Boardman, L., Marlin, D., & Terblanche, J. S. (2016). Physiological mechanisms of dehydration tolerance contribute to the invasion potential of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) relative to its less widely distributed congeners. *Frontiers in Zoology*, 13(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0147-z>
- Weldon, C. W., Nyamukondiwa, C., Karsten, M., Chown, S. L., & Terblanche, J. S. (2018). Geographic variation and plasticity in climate stress resistance among southern African populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Scientific Reports*, 8(1), 9849. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28259-3>
- Wong, M. K.-S., Nakao, M., & Hyodo, S. (2020). Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports*, 10(1), 21531. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77304-7>