



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
CANDIDATAS INVOLUCRADAS EN LA
RECEPCIÓN DE OLORES EN ADULTOS
DE *Anastrepha ludens* (LOEW)**

ALAN RUBÉN ESTRADA PÉREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: **Identificación de proteínas candidatas involucradas en la recepción de olores en adultos de *Anastrepha ludens* (Loew)**, realizada por el alumno: Alan Rubén Estrada Pérez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

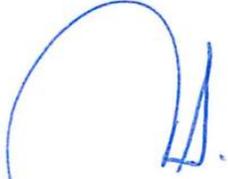
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



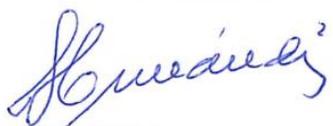
DRA. OBDULIA LOURDES SEGURA LEÓN

ASESOR



DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR

ASESOR



DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo de 2017

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CANDIDATAS INVOLUCRADAS EN LA RECEPCIÓN DE OLORES EN ADULTOS DE *Anastrepha ludens* (LOEW)

Alan Rubén Estrada Pérez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Los insectos utilizan las señales químicas para monitorear su ambiente, encontrar pareja, alimento y hospedero. Para el manejo integrado de plagas y monitoreo de poblaciones se utilizan feromonas sexuales o atrayentes. En investigaciones sobre las bases moleculares de la comunicación de insectos, particularmente en dípteros, se han identificado familias de proteínas involucradas en el proceso de comunicación. El estudio de proteínas que llevan a cabo el reconocimiento y recepción de moléculas de olor podría proveer un mejor entendimiento de los sistemas de comunicación en insectos y mejorar las estrategias de manejo. *Anastrepha ludens* es una plaga polífaga que ataca principalmente cítricos y mango en México, que provoca pérdidas económicas y limitando su exportación. La importancia de la comunicación química en plagas de insectos se ha centrado en la identificación de proteínas involucradas en la percepción de olores en adultos. En el presente estudio se construyó y secuenció una librería de cDNA de cabezas de adultos jóvenes de *A. ludens*, a partir de 50 hembras y machos (en proporción 1:1). Las secuencias se ensamblaron *de novo*, de las cuales alrededor de 7,500 transcritos fueron anotados con términos GO. A partir de estas se identificaron 19 secuencias de proteínas de unión a olores (OBPs), 2 proteínas quimiosensoriales (CSPs) y 1 proteína de membrana de neurona sensorial (SNMPs). El análisis filogenético de las OBPs con sus correspondientes en *D. melanogaster* permitió clasificar las OBPs de *A. ludens* en las subfamilias Clásica, Menos-C, Más-C y en la subfamilia Dímero. Las proteínas de percepción de olores fueron similares a proteínas en otros dípteros, particularmente de la familia Tephritidae. En las OBPs la mayor similitud se obtuvo con *Anastrepha fraterculus* y *A. obliqua*, las únicas especies dentro del género estudiadas hasta ahora. Los transcritos identificados en este estudio son los primeros reportes para *A. ludens*. El número de OBPs podría incrementarse en estudios posteriores con otros tejidos o estados de desarrollo.

Palabras clave: *Anastrepha ludens*, anotación GO, comunicación química, mosca mexicana de la fruta.

IDENTIFICATION OF CANDIDATE PROTEINS INVOLVED IN ODORANT RECEPTION IN ADULTS OF *Anastrepha ludens* (LOEW)

Alan Rubén Estrada Pérez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Insects use chemical signals to monitor their environment find mate, food and host. In pests integral management and population monitoring pheromones and attractants are used. In research involving molecular mechanisms in insect communication, mainly in dipteran, there have been identified protein families involved in communication process. Study of proteins that recognize and receive odorant molecules may provide a better understanding of insect communication systems and improve management strategies. *Anastrepha ludens* is a polyphagous species that attack citrus and mango in Mexico, which causes economical loses limiting their exportation. The importance of chemical communication in insect pests turns efforts to identify proteins involved odorant perception of adults. In this study a cDNA library was build and sequenced. The library included 50 female and male (1:1 ratio) *A. ludens* adults. Sequences were *de novo* assembled, from which 7,500 transcripts were annotated with GO terms. Nineteen odorant binding proteins (OBPs) were identified, two chemosensory proteins (CSPs) and one sensory neuron membrane protein (SNMP). OBPs phylogenetic analysis with the corresponding OBPs in *D. melanogaster* led to classify *A. ludens* OBPs in the subfamilies Classic, Minus-C, Plus-C and Dimer. Odorant perception proteins were similar to proteins in other dipteran, particularly from the family Tephritidae. The maximum similarity in OBPs was found with *Anastrepha fraterculus* and *A. obliqua*, the only sequences in the genera studied until now. Transcripts identified in this study are the first report for *A. ludens*. OBPs number might increase in further studies using other tissues or developmental stages.

Key words: *Anastrepha ludens*, GO annotation, chemical communication, Mexican fruit fly.

DEDICATORIA

A mi amada esposa **Cristina** por todo su enorme cariño, comprensión y apoyo durante esta etapa de nuestra vida, sin los cuales este proyecto no habría sido posible. Quiero que sepa que aunque el camino ha sido complicado, por momentos largo y apretado, siempre hemos salido adelante y lo seguiremos haciendo como un equipo. Simplemente, no lo habría logrado sin ti
Cristi y este también es tu logro.

A mis padres, **Rubén y Hortensia**, quienes siempre me han apoyado. No hubiera llegado tan lejos sin ustedes y sus enseñanzas.

A mis hermanos **Jonatan y Joel** por crecer y aprender conmigo.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en esta gran institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo financiero durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga, al M. en C. José Abel López Buenfil y al M. en C. José Manuel Cambrón Crisantos, autoridades del SENASICA que permitieron el uso y participación de dicha institución para llevar a cabo este trabajo.

Al M. en C. José Luis Cruz Jaramillo por el apoyo para la preparación y secuenciación de la librería. Parte esencial de este proyecto.

A los doctores Obdulia Lourdes Segura León, Juan Cibrián Tovar y Fidel de la Cruz Hernández Hernández, miembros del consejo particular

A mis profesores, quienes contribuyeron a mi formación en el programa de Fitosanidad-Entomología y Acarología, porque sus enseñanzas enriquecieron este trabajo.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia de <i>Anastrepha ludens</i>	4
Proteínas de unión a olores.....	4
Receptores de olores.....	5
Proteínas de membrana de neurona sensorial.....	6
Receptores ionotrópicos	6
Proteínas quimiosensoriales	7
OBJETIVOS.....	8
Objetivo General	8
Objetivos Particulares.....	8
HIPÓTESIS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Obtención de material biológico	9
Extracción de RNA total	9
Análisis bioinformático y ensamble de las secuencias.....	9
Análisis filogenético de proteínas de percepción de olores.....	10
Análisis filogenético y clasificación de AludOBPs.....	10
Análisis filogenético de SNMP y CSP	11
RESULTADOS	12
Ensamble y anotación.....	12
Transcritos candidatos de proteínas de percepción de olores.....	14
Ontología génica de proteínas de percepción de olores	15
Características de las AludOBPs	17
Características de SNMP y CSPs olfativos de <i>A. ludens</i>	17
Análisis de la filogenia de proteínas de percepción de olores.....	19
Análisis filogenético de AludOBPs vs DmelOBPs	19
Análisis filogenético de AludSNMP1	23

Análisis filogenético de AludCSPs	24
DISCUSIÓN.....	25
Distribución de cisteínas en las OBPs y CSPs de <i>A. ludens</i>	25
Clasificación de las OBPs de <i>A. ludens</i>	26
Posibles sitios de expresión de las proteínas identificadas.....	28
CONCLUSIONES	31
LITERATURA CITADA.....	32
ANEXOS.....	36

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Similitud media de los transcritos de <i>A. ludens</i> con secuencias homólogas en otros dípteros.....	14
Cuadro 2. Número de residuos alineados con BLASTX de los candidatos de proteínas de percepción de olores de <i>A. ludens</i> con proteínas homólogas en otros dípteros.....	15
Cuadro 3. Términos GO de los transcritos de percepción de olores.....	16
Cuadro 4. Clasificación de las OBPs en <i>A. ludens</i>	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución por módulo de Blast2GO de las secuencias analizadas de <i>A. ludens</i>	12
Figura 2. Gráficas de pastel nivel 3 de los términos GO por categoría.....	13
Figura 3. Alineamiento de AludOBP99b con varias especies de dípteros.....	17
Figura 4. Alineamiento de proteínas de la ruta olfativa en <i>A. ludens</i>	18
Figura 5. Relaciones filogenéticas de las OBPs de <i>A. ludens</i> y <i>D. melanogaster</i>	19
Figura 6. Relaciones filogenéticas de las OBPs de <i>A. ludens</i> y sus homólogos.....	21
Figura 7. Relaciones filogenéticas de las SNMPs de <i>A. ludens</i> y sus homólogos en otros dípteros.....	23
Figura 8. Relaciones filogenéticas de las CSPs de <i>A. ludens</i> y sus homólogos.....	24

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Afra: *Anastrepha fraterculus*

Aobl: *Anastrepha obliqua*

Bcuc: *Bactrocera cucurbitae*

Bdor: *Bactrocera dorsalis*

Bole: *Bactrocera oleae*

Btau: *Bactrocera tau*

Ccap: *Ceratitis capitata*

CSP: Proteína quimiosensorial

Csty: *Calliphora stygia*

Cves: *Carpomya vesuviana*

Dbip: *Drosophila bipectinata*

Dant: *Delia antiqua*

Dmel: *Drosophila melanogaster*

Dpla: *Delia platura*

GO: Ontología génica

Gmor: *Glossina morsitans morsitans*

IR: Receptor ionotrópico

OBP: Proteína de unión a olor

ODE: Enzima degradadora de olor

OR: Receptor de olor

ORN: Neurona receptora de olor

Rzep: *Rhagoletis zephyria*

SNMP: Proteína de membrana de neurona sensorial

INTRODUCCIÓN

Los insectos interpretan su mundo principalmente mediante estímulos químicos, los cuales les permiten orientarse dentro de éste. Los estímulos olfativos proveen información para localizar individuos de la misma especie para reproducirse, encontrar hospedero, detectar depredadores y conocer las condiciones ambientales (Vosshall y Stocker, 2007; de Bruyne y Baker, 2008; Hansson y Stensmyr, 2011).

La percepción de olores se trata de un proceso complejo en el cual se han identificado componentes que conforman las mezclas de olores a los que responden los insectos. La comunicación química en insectos se utiliza para el manejo y monitoreo de especies de importancia agrícola (Witzgall *et al.*, 2010). A nivel molecular se conocen los principales componentes que intervienen en el proceso de recepción de olores, los cuales comprenden a las proteínas de unión de olores (OBPs), los receptores de olores (ORs), los receptores ionotrópicos (IRs), las proteínas de membrana de neuronas sensoriales (SNMPs), las proteínas quimiosensoriales (CSPs) y las enzimas degradadoras de olores (ODEs) (Sachse y Krieger, 2011; Wu *et al.*, 2015).

La ruta olfativa comienza con la entrada de moléculas de olor (hidrófobas) a través de poros presentes en la superficie de sénsulos ubicados en la superficie de la antena. Las moléculas son capturadas por las OBPs, quienes las transportan a través de la linfa antenal (hidrofílica), hasta el OR correspondiente en la membrana de la dendrita de una neurona receptora de olor (ORN). La interacción entre la molécula de olor y el receptor específico produce un potencial de acción que se transmite a través del nervio antenal hasta el lóbulo antenal (AL). El lóbulo antenal es un neuropilo olfatorio que integra y codifica la información olfativa (Rützler y Zwiebel, 2005; Sachse y Krieger, 2011). Aquellas ORNs que expresan un OR determinado convergen en uno o dos glomérulos dentro del lóbulo antenal. La comunicación entre glomérulos, excitatoria o inhibitoria, está dada por las interneuronas locales (LNs). En cambio, la comunicación con los centros olfatorios superiores (cuerpos fungosos y cuerno lateral) se realiza a través de las neuronas de proyección (PNs). Los cuerpos fungosos controlan distintas formas de aprendizaje como el olfativo, la actividad locomotora, el comportamiento de cortejo del macho y el sueño.

En cuerno lateral se encarga del reconocimiento de olor independiente de la experiencia (Vosshall y Stocker, 2007).

Además de las proteínas mencionadas existen proteínas adicionales con funciones similares o complementarias, como: las CSP que forman un grupo de pequeñas proteínas solubles con capacidad para unir y acarrear componentes de la mezcla feromonal, que no está relacionado con las OBPs (Ozaki *et al.*, 2008); las SNMPs que son proteínas de membrana que se sugiere participan como correceptor de feromonas y juegan un papel importante en la cinética de la respuesta a la feromona, las SNMPs que actúan de manera conjunta con los receptores de feromonas y las proteínas de unión de feromona o PBPs (Sachse y Krieger, 2011; Leitch *et al.*, 2015); los IRs en cambio son proteínas de membrana que pueden participar directamente como receptores formando heterómeros (Sachse y Krieger, 2011); y finalmente las ODEs se encargan de inactivar rápidamente la señal, una vez que esta se ha transmitido, lo cual permite al insecto orientarse de manera precisa (Leal, 2011).

En años recientes se ha incrementado el número de estudios sobre ecología química de insectos, particularmente sobre los componentes moleculares que intervienen en la ruta olfativa. Este incremento ha ocurrido debido a la importancia que tienen estos componentes en la efectividad de las técnicas de manejo de plagas de importancia agroalimentaria para diferentes países, al ser responsables de la detección de olores por parte del insecto (Bosa *et al.*, 2016).

Anastrepha ludens o mosca mexicana de la fruta es una plaga de importancia agroalimentaria con un amplio rango de hospederos frutales, que afecta al menos 60 variedades, principalmente cítricos (como naranja y toronja) y mango. El daño lo producen las moscas al ovipositar en el fruto y las larvas al alimentarse de éste, lo que ocasiona pérdidas económicas debido al daño directo de los cultivos. Estas pérdidas se incrementan por las reglamentaciones cuarentenarias que limitan la movilización de productos provenientes de áreas infestadas (Thomas y Loera-Gallardo, 1998).

Para el manejo de la mosca mexicana de la fruta en México se utilizan diferentes estrategias, entre ellas la comunicación química mediante el uso de trampas cebadas con proteína hidrolizada como atrayente olfativo, principalmente para el monitoreo de sus poblaciones. Adicionalmente se utiliza la técnica del insecto estéril (SIT), para la cual se hacen liberaciones

masivas de moscas radioesterilizadas en regiones productoras de cítricos (Thomas y Loera-Gallardo, 1998). A pesar del conocimiento de atrayentes y feromonas en *A. ludens* (Bosa *et al.*, 2016), se desconocen los genes y sus productos, que intervienen en la percepción de olores, por lo que deben explorarse los mecanismos moleculares para posiblemente desarrollar mejores estrategias para su control.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia de *Anastrepha ludens*

La mosca mexicana de la fruta, conocida como *Anastrepha ludens* (Loew), pertenece al grupo fraterculus dentro de la familia Tephritidae. Se trata de una especie polífaga que se distribuye de México hasta la región norte de Sudamérica (Dickens *et al.*, 1982; Aluja y Mangan, 2008). Esta plaga ataca principalmente cítricos y mango, en México y en América Central (Dickens *et al.*, 1982). Las hembras adulto seleccionan los frutos para la oviposición. Una vez que los huevos eclosionan, las larvas se alimentan del fruto lo que afecta su calidad y potencial comercialización (Aluja y Mangan, 2008). La presencia de la mosca mexicana de la fruta en zonas productoras ocasiona pérdidas económicas por daño directo a los frutos, limitando su movilización (Hernández *et al.*, 2007). Para su manejo en México se utilizan liberaciones masivas bajo la estrategia de SIT y trampas cebadas con proteína hidrolizada para el monitoreo (Thomas y Loera-Gallardo, 1998). Debido a la importancia de la comunicación química para que el insecto encuentre pareja y hospedero, se han realizado estudios de ecología química en los cuales se demostró que los componentes feromonales necesarios para producir una respuesta de cortejo son: (Z)-3-nonenol, (Z,Z)-3,6-nonadienol, (R,R)-(+)-anastrephina, (S,S)-(-)-anastrephina, (R,R)-(+)-epianastrephina y (S,S)-(-)-epianastrephina (Robacker, 1988; Robacker *et al.*, 1992). Por otro lado Bosa *et al.* (2016) también reconocen la importancia de la comunicación química en la eficiencia reproductiva. En este estudio se buscó conocer el impacto del origen y régimen de manejo de colonias de *A. ludens*, en su eficiencia reproductiva, para evaluar si las colonias utilizadas para SIT son capaces de competir con moscas silvestres. Los autores mencionan que las moscas de las colonias deben ser capaces de localizar a su hospedero y pareja para aparearse, lo cual claramente involucra al sistema olfativo. A la fecha los componentes moleculares de percepción de olores en *A. ludens* no se han descrito y en años recientes se ha comenzado a estudiar moscas de la fruta de la familia Tephritidae (Wu *et al.*, 2015).

Proteínas de unión a olores

Las OBPs son las primera en interactuar con las moléculas de olor en la ruta olfativa. Estas proteínas son pequeñas y globulares con alrededor de 135-220 residuos de aminoácidos de longitud. Se caracterizan por presentar seis α -hélices y seis cisteínas altamente conservadas que

forman dos o tres puentes disulfuro, los cuales estabilizan la estructura de la proteína y contribuyen a la formación de la cavidad de unión, la cual forma en su interior un ambiente hidrofóbico. Estas proteínas han sido clasificadas en función de sus características y relaciones filogenéticas en varias subfamilias denominadas: Clásica (seis cisteínas); Menos-C (menos de seis cisteínas, generalmente cuatro); Más-C (más de seis cisteínas); y Dímero (formadas por dos OBPs consecutivas) (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009; Campanini y de Brito, 2016). Las OBPs unen y solubilizan moléculas de olor hidrofóbicas y las transportan a través de la linfa del sésulo hasta el receptor correspondiente en la membrana de la dendrita de la ORN (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009; Andersson *et al.*, 2013; Campanini y de Brito, 2016). Sin embargo la presencia de las OBPs no se restringe al tejido olfativo por lo que se sugiere que su presencia en otros órganos esté relacionada con su participación en la unión y transporte de feromonas sexuales y sus precursores (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2015).

Los OBPs presentan distintos espectros de ligandos con algunos parcialmente traslapados y otros con mayor especificidad hacia determinados ligandos. Las OBPs con ligandos que participan en el reconocimiento especie-específico de componentes feromonales son conocidas como proteínas de unión a feromonas (PBPs). Sobre su mecanismo de acción aún se tiene incertidumbre si el complejo proteínas-olor activa directamente al receptor o si la molécula de olor o feromona se libera cerca del receptor para luego activarlo. Las evidencias hasta ahora apoyan ambas teorías. Sin embargo a favor del segundo caso, se ha demostrado que ocurre un cambio conformacional dependiente del valor de pH que produce la liberación de la molécula de olor cerca de la membrana de la dendrita de la ORN (Hansson y Stensmyr, 2011; Sachse y Krieger, 2011).

Receptores de olores

Los ORs de insectos son un conjunto de proteínas altamente divergente, que no presentan homologías con los ORs de vertebrados y nematodos. Son receptores con siete dominios transmembrana con topología invertida con respecto a receptores acoplados a proteína G en vertebrados, es decir, presentan un extremo N-terminal intracelular y un extremo C-terminal extracelular. Los ORs forman complejos heteroméricos típicamente compuestos de un OR que se encarga de unir al ligando y un correceptor denominado ORCO. El correceptor funciona como chaperona y contribuye a la transducción de la señal (Hansson y Stensmyr, 2011; Sachse y

Krieger, 2011). El correceptor ORCO es el único miembro de la familia OR que está altamente conservado entre las diferentes especies de insectos, que presenta un dominio intracelular muy largo. El correceptor ORCO forma un canal de cationes no selectivo involucrado en la transducción de la señal olfativa (Sachse y Krieger, 2011). Algunos ORs muestran diferente grado de especificidad por un lado ciertos receptores son altamente selectivos, mientras que otros responden a un amplio espectro de moléculas.

Los ORs que detectan componentes de la mezcla feromonal se conocen como receptores de feromonas o PRs (Sachse y Krieger, 2011). Los PRs son similares en estructura a los receptores de olores generales y también se heterodimerizan con el correceptor ORCO. Sin embargo forman un grupo más conservado que los ORs de especies relacionadas. Es probable que este hecho explique la similitud de ligandos de las mezclas feromonales de especies relacionadas o que sea evidencia de la presión de selección negativa a la que se encuentran sometidos (Sachse y Krieger, 2011).

Proteínas de membrana de neurona sensorial

Las proteínas de membrana de neurona sensorial son un conjunto de proteínas que pertenecen a la familia CD36, la cual se caracteriza por tener dos dominios transmembrana y un gran dominio de unión extracelular. Las CD36 reconocen, unen y transportan moléculas hidrofóbicas como: colesterol, ácidos grasos y complejos lípido-proteína, por lo que es posible que representen sitios de anclaje para complejos PBP-feromonas cerca de los receptores de feromonas (PRs). En dicho escenario, las SNMPs operan como correceptores que atrapan a la feromona y luego la ceden al PR vecino (Sachse y Krieger, 2011). Por ejemplo en estudios con *D. melanogaster* se encontró que el conjunto OBP76a (LUSH), OR76d, el correceptor ORCO y SNMP1 son necesarios para la detección del 11-cis-vaccenyl acetato (cVA), una feromona macho-específica. En este estudio se encontró que la SNMP1 posee un papel importante en las cinéticas de activación e inactivación de la respuesta en las ORNs (Li *et al.*, 2014).

Receptores ionotrópicos

Los IRs son estructuralmente diferentes a los ORs, se encuentran relacionados con los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluRs), sin embargo los IRs no presentan los aminoácidos necesarios para la interacción con el glutamato. En algunas ORNs de insectos es

posible identificar entre dos y cinco tipos de IRs. Además algunos IRs se encuentran altamente conservados, de manera similar a lo que ocurre con los ORCO (Sachse y Krieger, 2011).

Proteínas quimiosensoriales

Las proteínas quimiosensoriales (CSPs) son pequeñas proteínas solubles de alrededor de 120 aminoácidos, que a diferencia de las OBPs presentan cuatro residuos de cisteína conservados. Se han encontrado en órganos del gusto y olfato, así como en glándulas feromonales. Las CSPs poseen seis α -hélices que rodean una cavidad hidrofóbica, en la cual unen moléculas para transportarlas. En algunos casos se les ha encontrado en la linfa sensilar, lo que sugiere su función como acarreadoras de moléculas de olor e incluso se cree que funcionan como acarreadores de feromonas de contacto (Ozaki *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2015). El número de CSPs en insectos es muy reducido, por ejemplo en *D. melanogaster* se conocen cuatro y en *Anopheles gambiae* siete (Ozaki *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Identificar transcritos candidatos de proteínas involucradas en la recepción de olores en adultos jóvenes de *Anastrepha ludens*.

Objetivos Particulares

- Preparar y secuenciar una librería de cDNA a partir de una mezcla de cabezas de hembras y machos de *A. ludens* de uno a cuatro días de edad.
- Realizar ensamble y anotación de transcritos.
- Seleccionar transcritos candidatos involucrados en la recepción de olores.
- Analizar las relaciones filogenéticas de los transcritos de *A. ludens* con secuencias homólogas en otros dípteros.

HIPÓTESIS

Si la recepción de olores en los adultos de *Anastrepha ludens* permite la localización de alimento, hospedero y pareja, entonces los transcritos que codifican para las proteínas involucradas en la recepción de olores se podrán encontrar en adultos jóvenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de material biológico

Se colectaron adultos de *A. ludens* de la cría del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Se retiraron las cabezas de 50 adultos hembras y machos (proporción 1:1) de 1-4 días después de emerger. Las cabezas se colectaron por sexos en tubos Eppendorf y se almacenaron en 600 μ L de solución RNAlater (Invitrogen), hasta el momento de la extracción de RNA, de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega). La calidad del RNA se evaluó por electroforesis capilar (QIAxcel Advanced System, QIAGEN). La librería de cDNA se construyó con el kit TruSeq RNA Sample Preparation Kit v3 (Illumina) siguiendo las instrucciones del proveedor. La librería se secuenció por *paired end* en un secuenciador MiSeq (Illumina) con un cartucho TruSeq LT de 150 ciclos. La extracción de RNA total, preparación de librerías y secuenciación se realizaron en las instalaciones del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA, Unidad Tecámac.

Análisis bioinformático y ensamble de las secuencias

Se verificó la calidad de los *reads* (secuencias obtenidas del equipo MiSeq) con el programa FastQC v0.10.1 (Andrews, 2010). Se usó Trimmomatic v0.35 para remover y recortar *reads* con baja calidad (Bolger *et al.*, 2014) con los siguientes valores: *leading quality*: 25 (para eliminar bases al principio del *read* con calidad menor a la indicada); *trailing quality*: 35 (para eliminar bases al final del *read* con calidad menor a la indicada); y *minimum length*: 70 (para conservar los *reads* con una longitud de al menos 70 bases). Los resultados se verificaron con FastQC. Se hizo un ensamble *de novo* con Trinity v2.06 con el valor default de *kmer*=25 (Grabherr *et al.*, 2011). La verificación de la calidad del ensamble se hizo con el programa QUAST v3.2 (Gurevich *et al.*, 2013). Se buscaron proteínas homólogas con la subrutina BLASTX dentro de Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005), en la base de datos nr del NCBI con un *cutoff* de *e-value* menor de 1×10^{-3} . La predicción de dominios y sitios importantes se realizó con InterProScan (Jones *et al.*, 2014), dentro de Blast2GO. Se utilizó la subrutina de Mapeo en Blast2GO para recuperar los términos de ontología génica (GO) asociados con los *hits* obtenidos con BLASTX para cada secuencia. Los transcritos fueron anotados usando la función de Anotación GO con *e-value* de

1×10^{-6} , peso GO=5 y *cutoff*=55. Se utilizó la función Annex de Blast2GO para mejorar la anotación.

Se seleccionaron aquellos transcritos cuya descripción y términos GO asignados, correspondiera con proteínas involucradas en la recepción de olores para su posterior análisis. Los nombres de las OBPs se asignaron con base en la descripción de la anotación de Blast2GO, además de seguir la nomenclatura propuesta por Hekmat-Scafe *et al.* (2002). A los OBPs se les asignó el prefijo Alud seguido por el nombre del OBP de acuerdo con la descripción de la anotación. La presencia de dos o más transcritos asociados con la misma OBP se distinguió con un guión seguido de un número consecutivo. Los transcritos correspondientes a CSP y SNMP se nombraron de forma similar a las OBPs, utilizando el nombre de la proteína correspondiente.

Análisis filogenético de proteínas de percepción de olores

Análisis filogenético y clasificación de AludOBPs

En los transcritos candidatos de OBPs se realizó la traducción con el marco de lectura reportado en los resultados de BLASTX por Blast2GO. En caso de observar un codón de paro en las secuencias de *A. ludens*, se eliminó la sección correspondiente. Se construyó un árbol filogenético con secuencias de *A. ludens* (AludOBPs) y *D. melanogaster* (DmelOBPs) para clasificar las OBPs en subfamilias. Se incluyó a *D. melanogaster* debido a que sus OBPs se encuentran ampliamente descritas.

Las secuencias se alinearon con ClustalW y se realizó una prueba de modelos con eliminación parcial por máxima verosimilitud (ML). Se eligió el modelo WAG+G por el Criterio de Información de Akaike (AIC). Después se construyó el árbol por ML con bootstrap de 1000 réplicas en el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). El árbol se editó con FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2007).

Se construyó un segundo árbol filogenético para observar las relaciones entre AludOBPs y sus homólogos en otros insectos. Se incluyeron secuencias homólogas del género *Anastrepha* (Campanini y de Brito, 2016) obtenidas por BLASTP debido a que no se encontraban disponibles cuando se realizó la anotación. Secuencias de proteínas de *Anastrepha* junto con los *hits* de BLASTX se incluyeron si cumplían con los siguientes criterios: 1) identidad de 70% o superior; 2) al menos 50% de cobertura. Se hicieron excepciones cuando ninguna secuencias de

hit cumplió con los criterios para un determinado AludOBP. Se alinearon las secuencias con ClustalW y se realizó una prueba de modelos con eliminación parcial por ML. Se eligió el modelo WAG+G+I con el criterio AIC. El árbol se construyó por ML con bootstrap de 1000 réplicas. El análisis filogenético se llevó a cabo con el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016). El árbol se editó con FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2007).

Análisis filogenético de SNMP y CSP

Se realizó la traducción de los transcritos de SNMP y CSPs con el marco de lectura reportado por BLASTX en Blast2GO y se les dio el mismo tratamiento que a los OBPs para la construcción del árbol filogenético con sus homólogos, respectivamente. Se eligieron los modelos LG para AludSNMP1 y JTT+G+I para las AludCSPs. Se construyeron los respectivos árboles filogenéticos por ML con bootstrap de 1000 réplicas en MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Los árboles se editaron con FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2007).

RESULTADOS

Ensamble y anotación

Se secuenciaron 4,843,126 *reads* (A1), de los cuales después del control de calidad se mantuvieron 4,058,706 con una longitud de 70 a 76 pb (A2). Se ensamblaron *de novo* 15,615 transcritos. La longitud media de transcrito (N50) fue 1,157 pb y el porcentaje de GC fue 39.55%. Se anotaron por ontología génica 7,708 transcritos (Figura 1).

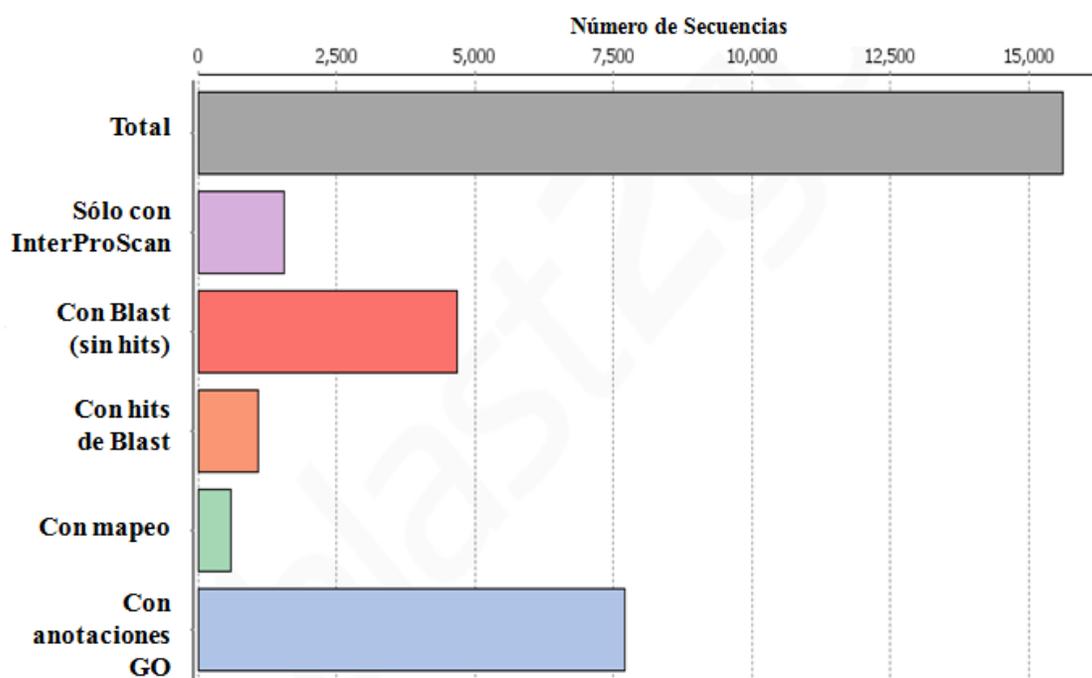


Figura 1. Distribución por módulo de Blast2GO de las secuencias analizadas de *A. ludens*.

Se obtuvo el número de transcritos por categoría GO con un término GO asociado (Figura 2). Los principales términos de ontología génica (GO) en la categoría de Componente Celular fueron: “intracelular” (3,790), “parte intracelular” (3,629) y “organelo intracelular” (2,975); en la categoría de Función Molecular fueron: “unión de ión” (2,037), “unión de compuesto cíclico orgánico” (1,972) y “unión de compuesto heterocíclico” (1,963); y en la categoría de Proceso Biológico fueron: “proceso celular de organismo simple” (3,889), “proceso metabólico de sustrato orgánico” (3,653), “proceso metabólico primario” (3,456) y “proceso metabólico celular” (3,352).

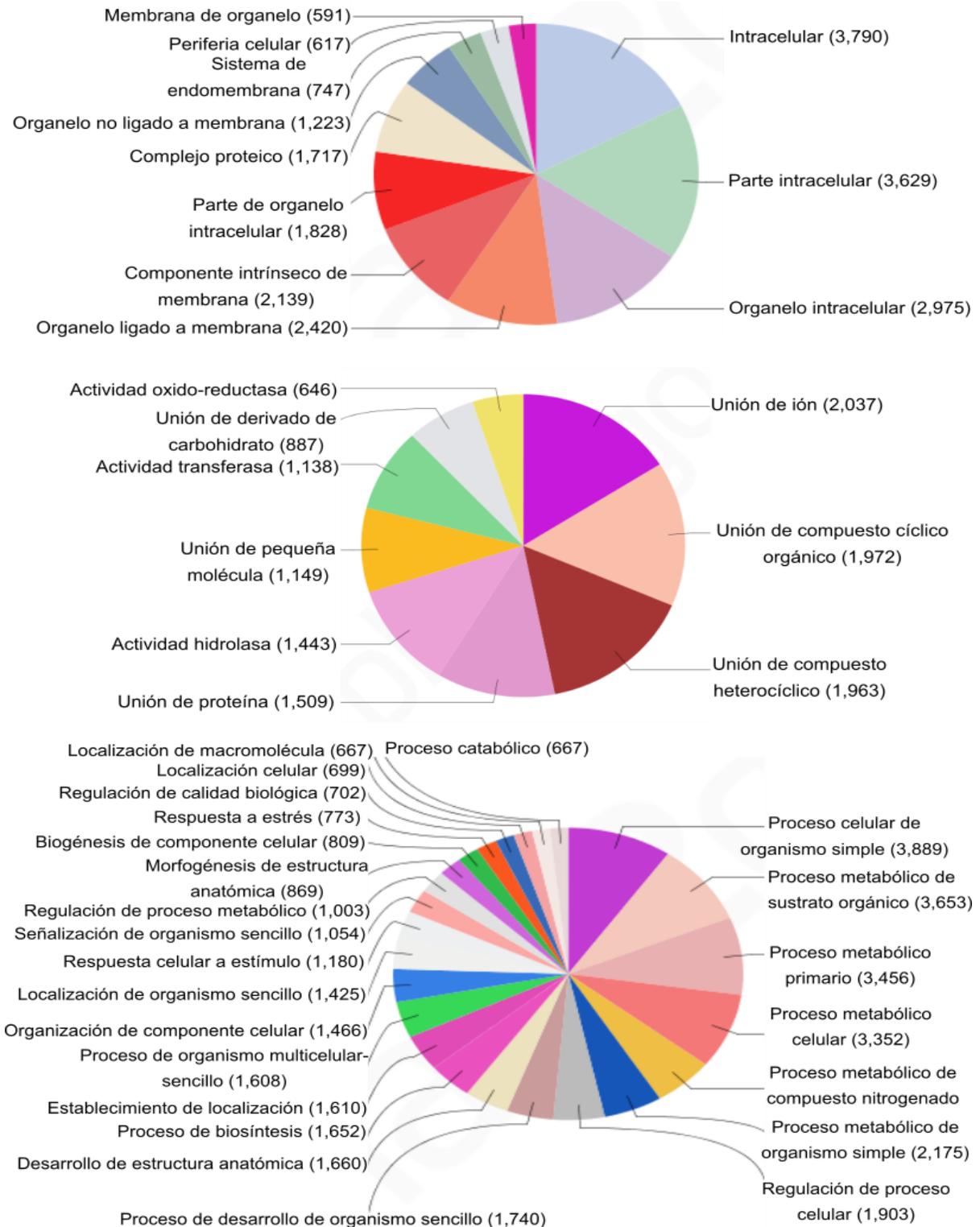


Figura 2. Gráficas de pastel nivel 3 de los términos GO por categoría. Arriba: Componente celular; Centro: Función molecular; Abajo: Proceso biológico. Los números corresponden a la cantidad de secuencias con el término GO indicado.

Transcritos candidatos de proteínas de percepción de olores

Se identificaron y anotaron 19 transcritos candidatos correspondientes a OBPs, 1 transcrito de SNMP (AludSNMP1) y 2 transcritos de CSPs (AludCSP3 y AludCSP4) (Cuadro 1). La longitud de los transcritos candidatos de OBPs varió desde 251 hasta 997 pb. Para AludSNMP1, AludCSP3 y AludCSP4 las longitudes fueron: 391, 466 y 575 pb, respectivamente. Se encontraron dos isoformas para AludOBP56a. Los transcritos AludOBP19a-1 y AludOBP19a-2 corresponden a genes diferentes. La similitud media para las OBPs con sus respectivos *hits* se encontró entre 55.55% y 90.4%. Las similitudes medias de AludCSP3 y AludCSP4 fueron: 85.25% y 89.15%, respectivamente; y de AludSNMP1 fue: 88.8%.

Cuadro 1. Similitud media de los transcritos de *A. ludens* con secuencias homólogas en otros dípteros.

Transcrito	Similitud media	<i>e-value</i> *	Transcrito	Similitud media	<i>e-value</i> *
AludOBP8a	66.35%	3.96X10 ⁻⁸⁰	AludOBP83a-like	90.4%	4.71X10 ⁻⁸¹
AludOBP19a	86%	5.32X10 ⁻⁵³	AludOBP83ef	71.05%	3.03X10 ⁻¹⁶⁵
AludOBP19d	59.45%	6.46X10 ⁻⁴⁴	AludOBP83g	87.9%	1.57X10 ⁻⁷⁷
AludOBP19d-like-1	77.75%	1.56X10 ⁻²²	AludOBP84a-like	73.2%	1.82X10 ⁻⁷⁸
AludOBP19d-like-2	64.4%	2.56X10 ⁻²²	AludOBP99a-like	83.9%	3.86X10 ⁻⁸²
AludOBP28a-like	75%	1.25X10 ⁻³²	AludOBP99b	73%	8.56X10 ⁻⁶²
AludOBP49a	55.55%	6.75X10 ⁻⁷²	AludOBP99c	56.7%	3.81X10 ⁻⁴⁷
AludOBP50c	57.75%	2.94X10 ⁻¹¹⁶	AludOBP OS F	81.85%	2.76X10 ⁻⁹⁸
AludOBP56a-1	64.65%	1.17X10 ⁻⁹³	AludCSP3	85.25%	3.25X10 ⁻⁷¹
AludOBP56a-2	64.6%	1.6X10 ⁻⁹³	AludCSP4	89.15%	1.51X10 ⁻⁶¹
AludOBP57c-like	65.3%	4.72X10 ⁻⁵³	AludSNMP1	88.8%	5.37X10 ⁻⁷⁷

**e-value* del mejor resultado de la búsqueda con BLASTX.

Las especies con las que se encontró mayor similitud mediante BLAST para las OBPs fueron *A. fraterculus*, *A. obliqua*, *Bactrocera dorsalis*, *B. oleae* y *B. cucurbitae*, todas pertenecientes a la familia Tephritidae (Cuadro 2 y A5). En *A. ludens* se identificaron OBPs no reportadas en otras especies estudiadas del género *Anastrepha*: AludOBP28a-like, AludOBP50c, AludOBP83a-like, AludOBP84a-like, y AludOBP OS F. Para AludSNMP1 y AludCSPs no se encontraron homólogos dentro del género *Anastrepha*, aunque si dentro de la familia Tephritidae como *Bactrocera dorsalis*, *B. oleae* y *C. capitata* (A6).

Cuadro 2. Cobertura de los transcritos de OBPs de *A. ludens* con OBPs de dípteros.

Transcrito	Longitud en <i>A. ludens</i>		Cobertura (Long. de la secuencia en aa / long. del hit en aa)					
	pb	aa	Afra	Aobl	Bdor	Bole	Ccap	Otros
AludOBP8a	721	240.3	155/155*	155/155*	154/159	154/159	157/162	129/155 ⁵
AludOBP19a	395	131.7	-	94/148*	94/148	94/148	94/147	94/162 ⁴
AludOBP19d	654	218	-	-	140/144	140/143	140/142	146/150 ¹
AludOBP19d-like-1	276	92	68/156*	68/156*	68/157	68/157	68/158	-
AludOBP19d-like-2	282	94	-	-	92/144	93/143	54/79	71/150 ¹
AludOBP28a-like	251	83.6	-	-	82/147	82/147	82/147	-
AludOBP49a	611	203.7	199/189*	199/189*	199/209	183/206	202/221	191/212 ⁴
AludOBP50c	942	314	138/258*	258/258*	240/250	-	255/253	-
AludOBP56a-1	848	282.7	121/121*	-	165/165	165/165	165/165	95/137 ³
AludOBP56a-2	798	266	121/121*	-	165/165	165/165	165/165	95/137 ¹
AludOBP57c-like	693	231	164/177*	164/177*	154/184	150/184	138/186	80/148 ³
AludOBP83a-like	685	228.3	-	-	139/148	130/148	130/148	128/149 ⁴
AludOBP83ef	997	332.3	254/254*	254/254*	274/274	243/268	291/584	212/245 ¹
AludOBP83g	981	327	142/142*	141/141*	123/142	123/142	124/142	122/146 ¹
AludOBP84a-like	650	216.7	-	-	141/167	141/167	142/178	116/174 ²
AludOBP99a-like	810	270	150/150*	150/150*	135/149	135/149	135/149	133/151 ²
AludOBP99b	549	183	152/152*	152/152*	125/151	147/154	127/149	126/149 ¹
AludOBP99c	603	201	117/117	-	139/149	139/149	139/149	139/151 ¹
AludOBP OS F	956	318.7	-	-	155/155	155/145	157/157	158/174 ¹
AludCSP3	466	155.3	-	-	121/156	121/156	126/162	106/155 ¹
AludCSP4	575	191.6	-	-	111/111	111/111	111/111	100/112 ¹
AludSNMP1	391	130.3	-	-	129/535	129/535	129/535	129/551 ¹

Afra: *A. fraterculus*; Aobl: *A. obliqua*; Bdor: *Bactrocera dorsalis*; Bole: *B. oleae*; Ccap: *Ceratitis capitata*; ¹: *D. melanogaster*; ²: *D. persimilis*; ³: *D. pseudoobscura*; ⁴: *D. virilis*; ⁵: *D. willistoni*; *: Comparación realizada utilizando BLASTP, posterior al proceso de anotación.

Ontología génica de proteínas de percepción de olores

Como se esperaba el término “unión a olor” fue reportado para la mayoría de los transcritos dentro de la categoría GO de función molecular, excepto para el transcrito AludOBP Olfactory Specific F, el cual presentó “unión de feromona” y “unión de fenilalquilamina” como funciones moleculares (Cuadro 3). En AludSNMP1 destacan los términos “actividad *scavenger*”, “componente integral de membrana plasmática” y “respuesta a feromona”. Ambos AludCSPs

presentaron el término “componente integral de membrana”, lo cual resulta poco consistente con secuencias de CSPs de otros tefrítidos, las cuales están reportadas como proteínas solubles.

Cuadro 3. Términos GO de los transcritos de percepción de olores.

Proteína	Longitud final (aa)	Términos GO
AludOBP8a	156	F: unión de olor
AludOBP19a	94	F: unión de olor; C: componente integral de membrana
AludOBP19d	143	F: unión de olor
AludOBP19d-like-1	93	F: unión de olor
AludOBP19d-like-2	68	F: unión de olor
AludOBP28a-like	83	F: unión de olor
AludOBP49a	203	F: unión de olor
AludOBP50c	258	F: unión de olor
AludOBP56a-1	166	F: unión de olor
AludOBP56a-2	166	F: unión de olor
AludOBP57c-like	164	F: unión de olor; C: componente integral de membrana
AludOBP83a-like	180	F: unión de olor
AludOBP83ef	295	F: unión de olor
AludOBP83g	143	F: unión de olor; C: región extracelular; P: percepción sensorial de estímulos químicos
AludOBP84a-like	182	F: unión de olor
AludOBP99a-like	153	F: unión de olor
AludOBP99b	163	F: unión de olor
AludOBP99c	141	F: unión de olor
AludOBP OS F	155	F: unión de feromona, unión de fenilalquilamina; C: región extracelular; P: percepción sensorial de estímulos químicos
AludCSP3	122	F: unión a feromona; C: componente integral de membrana, región extracelular; P: percepción sensorial de estímulos químicos.
AludCSP4	127	C: componente integral de membrana, región extracelular.
AludSNMP1	129	F: actividad de receptor <i>scavenger</i> ; C: componente integral de membrana plasmática, dendrita, cuerpo de célula neuronal; P: homeostasis de lípidos, adhesión celular, receptor de superficie celular en ruta de señalización, respuesta a feromona, detección de estímulos químicos involucrados en la percepción de olor, respuesta de defensa.

F: función molecular; C: componente celular; P: proceso celular.

Características de las AludOBPs

Los resultados obtenidos mediante la anotación de la librería de cDNA de *A. ludens* coinciden con los obtenidos por otros autores, quienes señalan a las OBPs como las proteínas más abundantes de entre todo el repertorio involucrado en la percepción de olores (Wu *et al.*, 2015). Entre las 19 OBPs identificadas se encontraron miembros de las subfamilias Clásica, Menos-C, Más-C y Dímero con los residuos de cisteína característicos de las subfamilias (Figura 3 y A7).

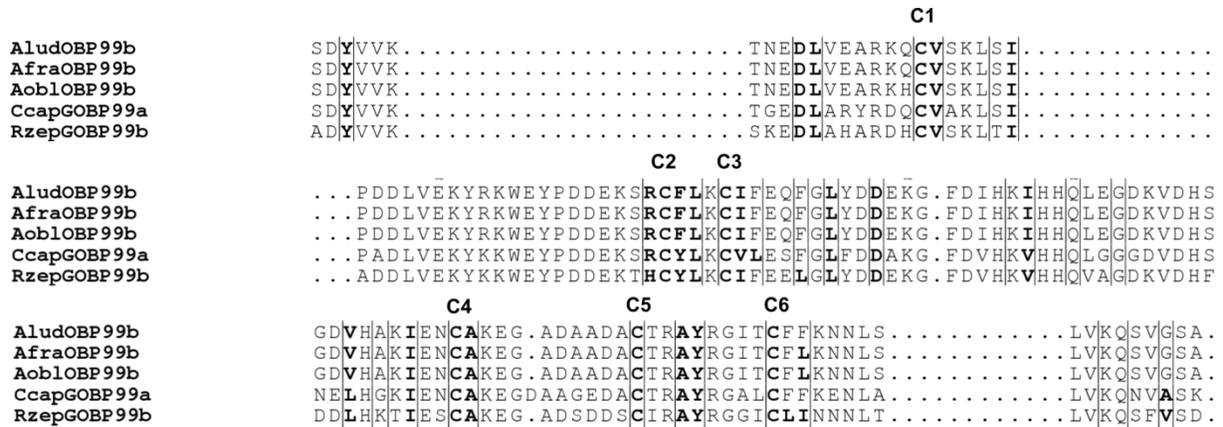


Figura 3. Alineamiento de AludOBP99b con varias especies de dípteros. Cisteínas conservadas marcadas C1-C6.

Cuando se compararon con sus secuencias homólogas AludOBP19a, AludOBP19d-like-1 y AludOBP19d-like-2 se observan como secuencias parciales con menor cobertura de sus homólogos. De acuerdo con el alineamiento, la distribución de los residuos conservados de cisteína para *A. ludens* fue: C1-X₂₆₋₂₉-C2-X₃-C3-X₃₂₋₄₃-C4-X₈₋₁₀-C5-X₈-C6. La distribución es similar a los reportes para éste género (Campanini y de Brito, 2016).

Características de SNMP y CSPs olfativos de *A. ludens*

En *A. ludens* se identificaron 1 SNMP y 2 CSPs que en número son menores a las OBPs, lo cual corresponde con reportes en otras especies. Como en el caso de *B. dorsalis*, en donde se reportan tres SNMPS y cuatro CSPs (Wu *et al.*, 2015). El alineamiento entre AludSNMP1 y sus homólogos en *Rhagoletis zephyria*, *C. capitata*, *B. oleae* y *D. melanogaster* mostró que en la región de traslape existen varios residuos con la misma identidad (Figura 4).

Por otro lado el alineamiento de AludCSPs obtuvo una cobertura con una longitud similar a la de CSPs de otros tefrítidos. Para AludCSP3 y AludCSP4 la región central se observó altamente conservada. Ambas AludCSPs mostraron cuatro residuos conservados de cisteína (Figura 4),

característicos de este grupo de proteínas. La distribución de las cisteínas fue: C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4.

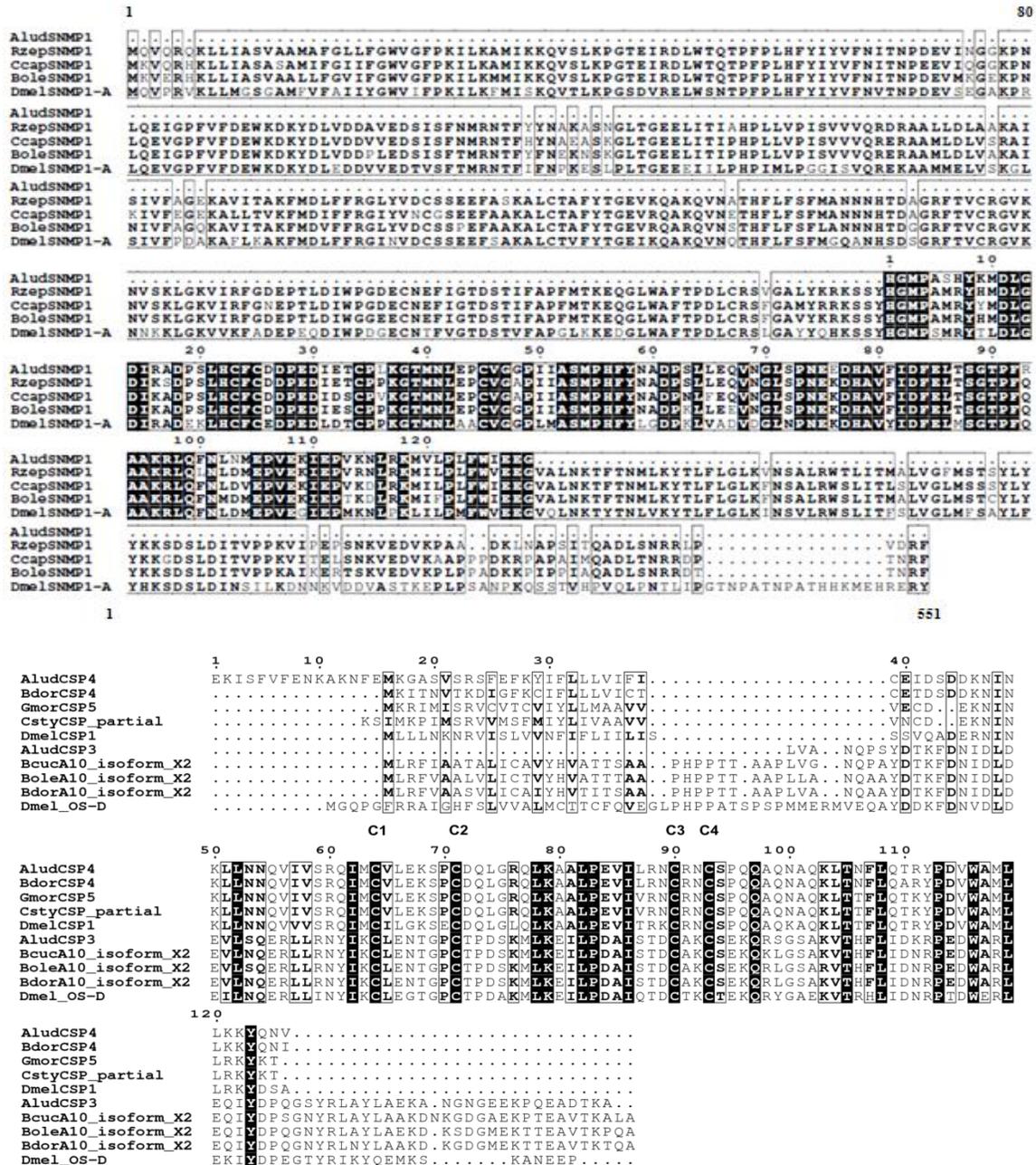


Figura 4. Alineamientos de proteínas de la ruta olfativa en *A. ludens* con sus homólogos en otros dípteros. Arriba: Alineamiento de SNMPs; Abajo: Alineamiento de CSPs.

Análisis de la filogenia de proteínas de percepción de olores

Análisis filogenético de AludOBPs vs DmelOBPs

La clasificación de las OBPs de *A. ludens* se realizó mediante su comparación con secuencias de *D. melanogaster* a través de un análisis filogenético por ML y bootstrap de 1000 réplicas (Figura 5). Lo que permitió ubicar las AludOBPs en subfamilias. De acuerdo con esta clasificación 13 secuencias se asignaron a la subfamilia Clásica, 3 a la Menos-C, 2 a la Más-C y 1 a la subfamilia Dímero. El grupo ABPII ha sido descrito para *Drosophila* y no está distribuido de forma equitativa en los dípteros.

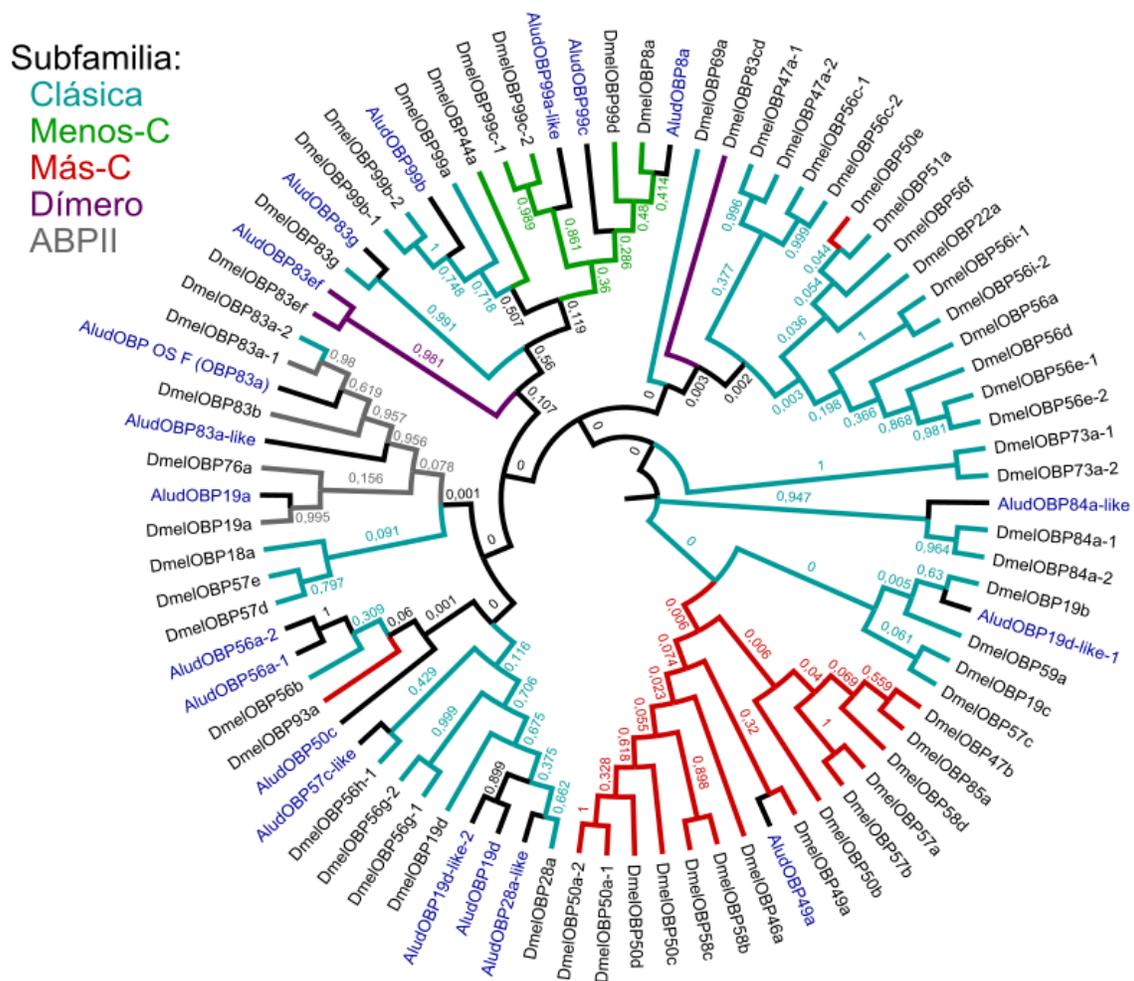


Figura 5. Relaciones filogenéticas de las OBPs de *A. ludens* y *D. melanogaster* (AludOBPs y DmelOBPs, respectivamente). Las ramas están coloreadas de acuerdo con la subfamilia de la secuencia. El soporte de las ramas se muestra como valores de bootstrap.

Por otro lado la reconstrucción filogenética por ML de las relaciones entre OBPs de especies con mayor porcentaje de similitud con los transcritos de *A. ludens* mostró que las OBPs de *A. ludens* se agruparon principalmente con secuencias homólogas de *A. obliqua*, *A. fraterculus* y *B. dorsalis*, todas miembros de la familia Tephritidae (Figura 6). En éste caso, los grupos que se forman por las proteínas coinciden con la clasificación de OBPs descrita por otros autores (Campanini y Brito, 2016; Siciliano *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2013). En esta reconstrucción de la historia evolutiva de los transcritos se observa que cada OBP de *A. ludens* se agrupa con su correspondiente OBP en otra especie, dentro de estas las que presentan mayor similitud en la composición de residuos de aminoácidos y por lo tanto menor longitud entre ramas fueron *A. ludens* con *A. fraterculus* y *A. obliqua*. Así mismo se observa la formación de grupos en donde la subfamilia Clásica y Más-C se agrupan por un lado y las subfamilias Menos-C y Dímero por otro. Dentro de estos grupos se observan procesos de diversificación entre las OBPs de la subfamilia Clásica y la subfamilia Más-C. Esto mismo se puede observar en los miembros de las subfamilias Menos-C y Dímero. El grupo de la subfamilia Menos-C incluye a OBP8a, OBP83g, OBP99a-like, OBP99b y OBP99c, de las cuales OBP83g y OBP99b se agruparon con OBPs miembros de la subfamilia Clásica en el árbol de AludOBPs y DmelOBPs. Sin embargo, debido a que *A. ludens* se encuentra más relacionado con *A. fraterculus* y *A. obliqua*, OBP83g y OBP99b fueron entonces clasificados como Menos-C.

Subfamilia:

Clásica
Menos-C
Más-C
Dímero
Atípica

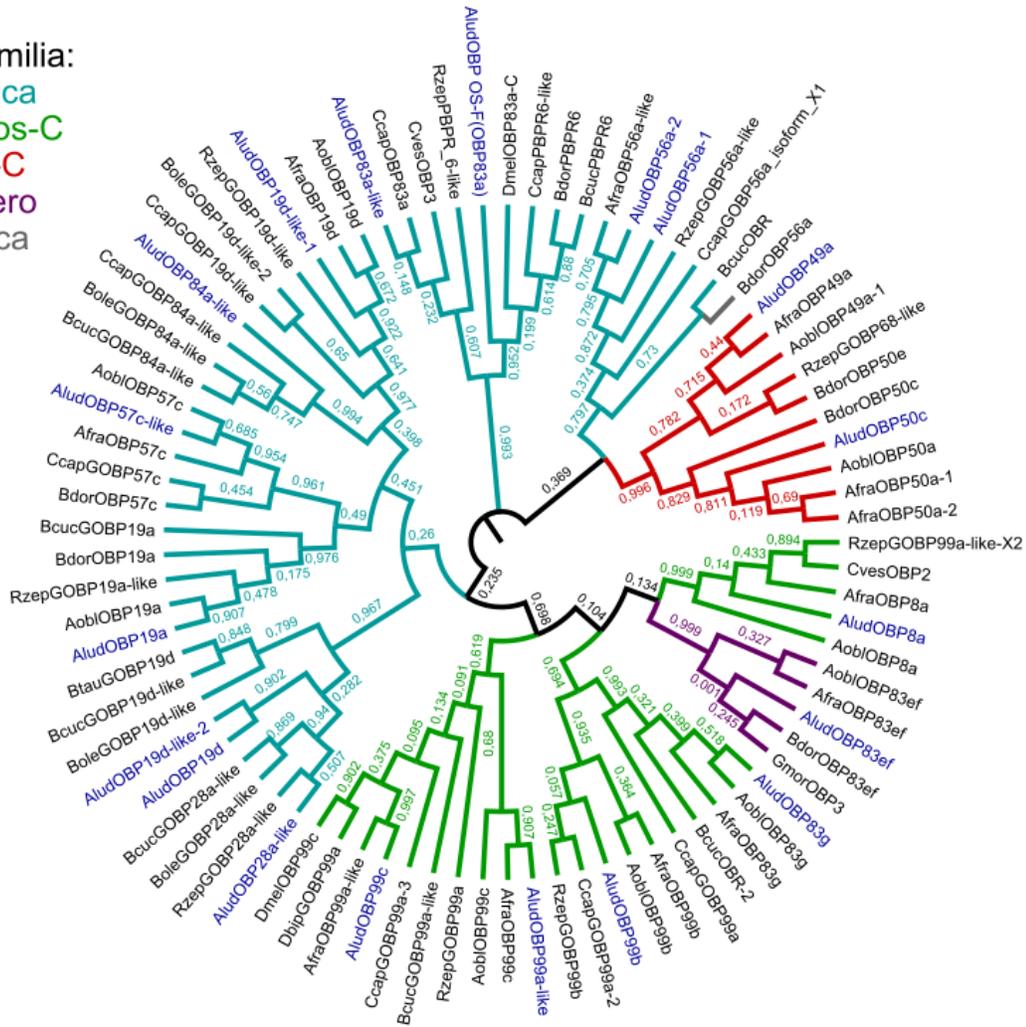


Figura 6. Relaciones filogenéticas de las OBPs de *A. ludens* y sus homólogos. Las ramas están coloreadas de acuerdo con la subfamilia de la secuencia. El soporte de las ramas se muestra como valores de bootstrap.

La proteína AludOBP8a se clasificó como Menos-C en el árbol de secuencias con mayor valor de similitud, debido a que se agrupó con AfraOBP8a y AoblOBP8a; ambas secuencias clasificadas en la misma subfamilia. De manera similar la clasificación para AludOBP83g fue diferente de DmelOBP83g, que pertenece a la subfamilia Clásica. De acuerdo con el grupo formado por AfraOBP83g y AoblOBP83g, AludOBP83g se trata de un miembro de la subfamilia Menos-C. Esto se puede deber a la similitud entre *A. ludens*, *A. fraterculus* y a *A. obliqua* y a medida que se cuenta con mayor información sobre especies relacionadas las inferencias filogenéticas pueden predecir con mayor probabilidad la historia evolutiva de las proteínas.

En el árbol se observa un grupo integrado por proteínas OBP83ef (Dímero), el cual en trabajos anteriores con *D. melanogaster* se observó que está relacionado con miembros de la subfamilia Clásica (Camapini y Brito, 2016), sin embargo en la reconstrucción filogenética de este análisis se agrupa con miembros de la subfamilia Menos-C. Esto último coincide con otros trabajos, los cuales integran OBPs de diferentes grupos de insectos (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009), y señalan que las OBPs Dímero se encuentran conformadas por dos OBPs Menos-C consecutivas (Sánchez-Gracia *et al.*, 2009). La subfamilia Más-C incluyó a dos miembros: AludOBP49 y AludOBP50c. Por lo que la subfamilia Clásica fue la más abundante con 11 transcritos de OBPs (Cuadro 4).

Cuadro 4. Clasificación de las OBPs en *A. ludens*.

OBPs	Subfamilia	Cys conservadas/ Cys totales	OBPs homólogas en el género <i>Anastrepha</i>
AludOBP8a	Menos-C	5/5	AfraOBP8a, AoblOBP8a
AludOBP19a	Clásica	5/5	AoblOBP19a
AludOBP19d	Clásica	6/7	-
AludOBP19d-like-1	Clásica	3/3	AfraOBP19d, AoblOBP19d
AludOBP19d-like-2	Clásica	3/3	AfraOBP19d, AoblOBP19d
AludOBP28a-like	Clásica	3/4	-
AludOBP49a	Más-C	3/12	AfraOBP49a, AoblOBP49a-1
AludOBP50c	Más-C	4/14	AfraOBP50a-1, AfraOBP50a-2, AoblOBP50a
AludOBP56a-1	Clásica	6/10	-
AludOBP56a-2	Clásica	6/10	-
AludOBP57c-like	Clásica	6/6	AfraOBP57c, AoblOBP57c
AludOBP83a-like	Clásica	6/7	-
AludOBP83ef	Dímero	6/14	AfraOBP83es, AoblOBP83ef
AludOBP83g	Menos-C	6/7	AfraOBP83g, AoblOBP83g
AludOBP84a-like	Clásica	6/8	-
AludOBP99a-like	Menos-C	4/5	AfraOBP99c, AoblOBP99c
AludOBP99b	Menos-C	6/6	AfraOBP99b, AoblOBP99b
AludOBP99c	Menos-C	4/4	-
AludOBP OS F	Clásica	6/6	-

Análisis filogenético de AludSNMP1

En la reconstrucción de esta proteína, con base en la región de sobre posición que se presentó con la secuencia de *A. ludens* en el alineamiento, se observa que AludSNMP1 se agrupó con el SNMP1 de *Rhagoletis zephyria* (bootstrap=0.323). En tanto que las SNMP1 provenientes de *Ceratitis capitata* y *Bactrocera dorsalis* formaron un grupo aparte con un soporte de bootstrap de 0.511. La SNMP1 de *D. melanogaster* es la más distante con respecto a los otros dos grupos (Figura 4). La confiabilidad de las ramas es baja, lo que se puede asociar con el reducido número de secuencias disponibles de esta proteína, sin embargo permite señalar que la secuencia de SNMP1 en *A. ludens* tiene mayor relación con la familia Tephritidae que con *Drosophilidae*.

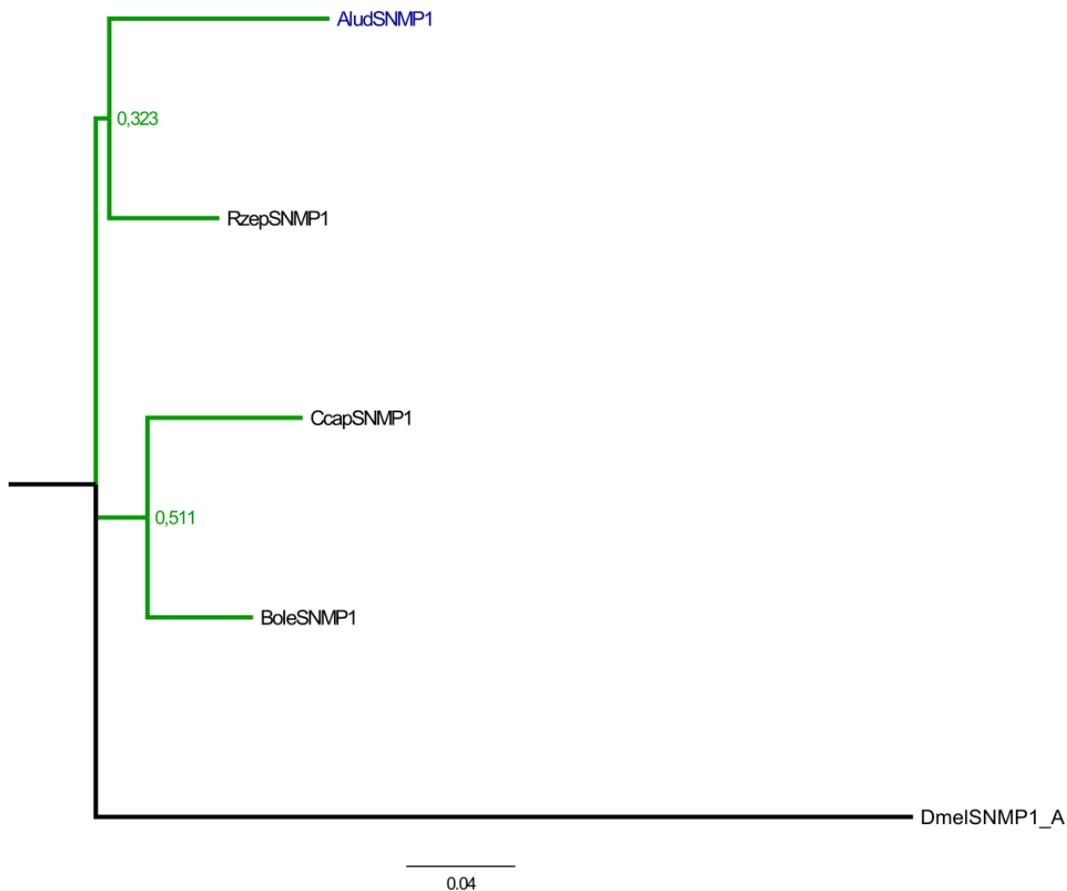


Figura 7. Relaciones filogenéticas de las SNMPs de *A. ludens* y sus homólogos en otros dípteros. El soporte de las ramas se muestra como valores de bootstrap.

Análisis filogenético de AludCSPs

En el análisis filogenético de los transcritos de CSPs con dos secuencias de *A. ludens* y seis secuencias de CSPs, se observa que los dos transcritos identificados como CSP formaron grupos independientes, por un lado AludCSP3 se agrupa con BoleA10 de *B. oleae*, mientras que AludCSP4 se agrupa con BdorCSP4 de *B. dorsalis*, en ambos casos las especies pertenecen a las moscas de la fruta de la familia Tephritidae.

La probabilidad de que las relaciones sean verdaderas es mayor por tener más información de estos genes y proteínas en especies relacionadas con las cuales se puede comparar, lo que se refleja en el mejor soporte de bootstrap de las ramas, principalmente en AludCSP4 y BdorCSP4 con bootstrap de 0.832.

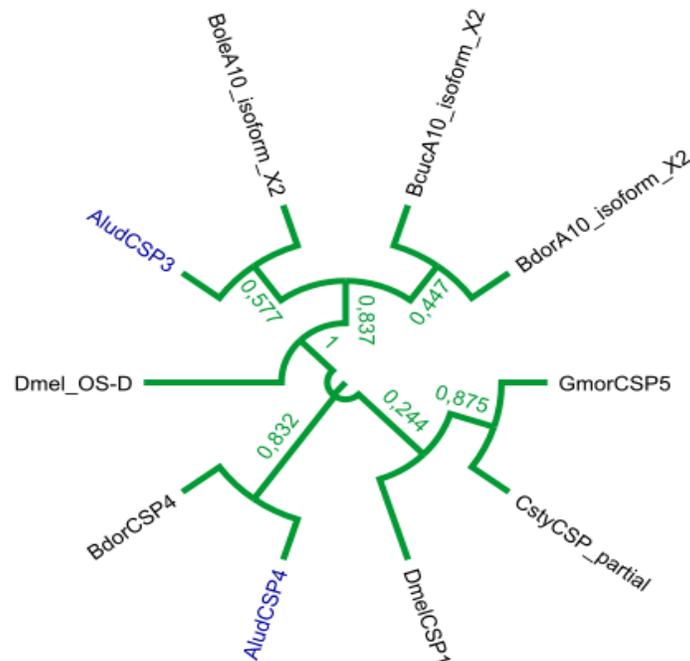


Figura 8. Relaciones filogenéticas de las CSPs de *A. ludens* y sus homólogos en otros dípteros. El soporte de las ramas se muestra como valores de bootstrap.

DISCUSIÓN

Distribución de cisteínas en las OBPs y CSPs de *A. ludens*

En este estudio se encontraron 19 OBPs candidatas, mediante ensamble *de novo*, expresadas en cabezas de adultos jóvenes de *A. ludens*. Para los cuales los residuos de cisteína y su distribución espacial son fundamentales para su clasificación. En el caso de la subfamilia Clásica en *Drosophila*, que es la especie más estudiada, su distribución es: X₂₂₋₆₈-C1-X₂₅₋₆₈-C2-X₃-C3-X₃₁₋₄₆-C4-X₈₋₂₉-C5-X₈₋₉-C6-X₅₋₇₁ (Pikielny *et al.*, 1994), donde X_p es cualquier aminoácido. Esta distribución indica que la distancia entre C2 y C3, al igual que entre C5 y C6, es muy corta: tres residuos para la primera y de ocho a nueve para la segunda. La distribución en esta subfamilia dentro del género *Anastrepha* es diferente y corresponde: C1-X₂₄₋₃₃-C2-X₃-C3-X₃₅₋₄₇-C4-X₈₋₁₈-C5-X₈-C6 (*A. fraterculus*) y C1-X₂₄₋₃₇-C2-X₃-C3-X₃₅₋₄₂-C4-X₈₋₁₂-C5-X₈-C6 (*A. obliqua*) (Campanini y Brito, 2016). Estas últimas fueron similares a la distribución obtenida mediante el alineamiento de las OBPs de *A. ludens* con sus homólogos; en donde la distancia entre C2 y C3 fue de tres residuos, lo que al parecer es una constante para OBPs a través de diferentes grupos de insectos (Xu *et al.*, 2009). Se observa un caso similar con el número de residuos entre C5 y C6, donde la distancia es muy cercana a 8 residuos: en *D. melanogaster* está entre 8 y 9 residuos, mientras que para el género *Anastrepha*, incluyendo *A. ludens*, es exactamente de 8.

La presencia de cisteínas en los diferentes grupos de insectos es variable. La clasificación de AlduOBP8a con secuencias de *D. melanogaster* agrupó a esta proteína dentro de la subfamilia Clásica, sin embargo en el alineamiento y análisis realizado con secuencias de mayor similitud, se encontró que AludOBP8a se agrupó con las OBP8a de *A. fraterculus* y *A. obliqua*. Tanto AludOBP8a como AfraOBP8a y AoblOBP8a carecen de C2 y poseen una cisteína cerca de C5, lo anterior sumado a la similitud de la secuencia, permitieron clasificar a AludOBP8a como miembro de la subfamilia Menos-C. Al igual que OBP8a, la clasificación se modificó para AludOBP99c, puesto que tanto AludOBP99c como AfraOBP99c y AoblBP99c no presentan C2 y C5. AludOBP83g también cambió su clasificación, debido a que se agrupó con AfraOBP83g y AoblOBP83g, ambos pertenecientes a la subfamilia Menos-C (Campanini y Brito, 2016).

En el caso de la proteína de la subfamilia Dímero, AludOBP83ef, esta tuvo un total de 14 residuos de cisteína, al presentar dos dominios de OBPs consecutivos, los cuales coinciden con

la descripción de proteínas para este grupo, AludOBP83ef presentó mayor número de cisteínas que *A. fraterculus* y *A. obliqua* (12 residuos) y que *B. dorsalis* y *D. melanogaster* (13 residuos). Los residuos adicionales presentes en esta OBP de *A. ludens* se ubicaron al inicio de la secuencia.

Algunos miembros de la subfamilia Menos-C en *A. fraterculus* y *A. obliqua* difieren de los presentes en *A. ludens*. Los OBPs de los primeros mostraron tres residuos de cisteína previos a C1 y tres posteriores a C6 (Campanini y Brito, 2016), mientras que en *A. ludens* las OBPs son más similares a *D. melanogaster*: AludOBP49a tiene cinco residuos de cisteína antes de C1, dos al final y uno entre C4 y C5. Una situación similar se observó en AludOBP50c y DmelOBP50c, en este caso ambos presentan 12 residuos con una distribución similar a lo largo de la secuencia.

Finalmente las CSPs tienen generalmente una longitud de 100 a 120 residuos de aminoácido y se encuentran muy conservadas entre especies (Xu *et al.*, 2009). El rango de longitud de las BdorCSPs se encuentra entre 111-156 residuos (Wu *et al.*, 2015), mientras que AludCSP4 tiene una longitud de 127 residuos y AludCSP3 de 122 residuos. Ambas proteínas presentaron una longitud similar a la de otros BdorCSPs. El patrón de distribución de estas proteínas reportado en dípteros es: C1-X₆₋₈-C2-X₁₈₋₁₉-C3-X₂-C4 (Xu *et al.*, 2009), patrón que coincide con el obtenido en el alineamiento de este estudio: C1-X₆-C2-X₁₈-C3-X₂-C4. En ortópteros como *Schistocerca gregaria* también se presentan cuatro cisteínas conservadas. Estas cisteínas forman puentes disulfuro entre residuos cercanos (Cys29-Cys38 y Cys57-Cys60), con 9, 19 y 3 residuos de distancia entre C1 y C2, C2 y C3, y C3 y C4, respectivamente (Xu *et al.*, 2009).

Clasificación de las OBPs de *A. ludens*

Las OBPs forman una familia de proteínas con alrededor de seis residuos de cisteína conservados en posiciones características y que además presentan un extremo N-terminal divergente (Hekmat-Scalfe *et al.*, 2002; Ramsdell *et al.*, 2010). Las OBPs son secretadas y liberadas en la linfa antenal por las células auxiliares, presentan una señal secretora dividida en una región N-terminal, una región central hidrofóbica y una región C-terminal polar (von-Heijne, 1986). Con base en la identificación de estas regiones conservadas, las herramientas informáticas actuales permitieron la identificación y anotación de secuencias homólogas de *A. ludens*. El número de transcritos identificados es similar al número de OBPs en otras especies del mismo género como: *A. fraterculus* (23 OBPs) y *A. obliqua* (24 OBPs) (Campanini y Brito,

2016). De entre las 19 OBPs encontradas en *A. ludens*, solo 12 han sido reportadas en adultos de *A. fraterculus* y *A. obliqua*, por lo que es probable que existan OBPs aún sin describir en *A. ludens*. Sin embargo con relación al número de transcritos descritos en dípteros se observa una gran variación en cuanto al número reportado en diferentes especies, por ejemplo en *D. melanogaster*, la especie mejor descrita, se conocen 63 transcritos correspondientes a 52 genes (Hekmat-Safe *et al.*, 2002); en *B. dorsalis* 34 transcritos correspondientes a 25 genes y en *Ceratitis capitata* 17 transcritos para 14 genes (Gomulski *et al.*, 2008; Siciliano *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2013).

En relación a la longitud de OBPs en otros tefrítidos se señala que existe variación en la longitud de estas proteínas, por ejemplo en *B. dorsalis* se encontró que la longitud de OBPs completas fue de 134 a 274 residuos de aminoácido (Wu *et al.* 2015); en *C. capitata* de 124 a 177 residuos (Siciliano *et al.*, 2014); en *Rhagoletis suavis* de 124 a 164 residuos (Ramsdell *et al.*, 2010); y en *A. fraterculus* y *A. obliqua* de 121 a 258 residuos (Campanini y Brito, 2016). En el caso de *A. ludens* se encontró que la longitud varió de 68 a 295 residuos, la más larga fue AludOBP83ef correspondiente a la subfamilia Dímero. Sin embargo, algunas de estas OBPs se obtuvieron como secuencias parciales probablemente debido al tipo de ensamble por lo que se requiere de la incorporación de más librerías con diferentes condiciones o repeticiones para determinar el número de OBPs en *A. ludens*. Las secuencias que se detectaron como parciales fueron: AludOBP19a, AludOBP19d-like-1 y AludOBP19d-like-2, las cuales requieren de estudios posteriores.

Con respecto a la clasificación en subfamilias de las AludOBPs, esta fue muy similar a la de las OBPs de *A. fraterculus* y *A. obliqua* (Campanini y Brito, 2016). *A. fraterculus* presentó 10 OBPs en las subfamilia Clásica, 6 en Menos-C, 5 en Más-C y 2 Dímero; *A. obliqua* presentó 10 OBPs en las subfamilia Clásica, 7 en Menos-C, 5 en Más-C y 2 Dímero. En *A. ludens* 11 OBPs pertenecen a la subfamilia Clásica, 5 a la Menos-C, 2 a la Más-C y 1 a la subfamilia Dímero. El cambio en la clasificación de AludOBP8a y AludOBP83g se soporta en el análisis de filogenia con sus homólogos de especies relacionadas (Figura 6).

De la familia Dímero se han señalado dos miembros: OBP83cd y OBP83ef, presentes en *D. melanogaster*, *A. obliqua*, *A. fraterculus* y *B. dorsalis*. En *A. ludens* sólo se encontró a OBP83ef. Esto puede ser debido al estado de desarrollo que se evaluó puesto que en *B. dorsalis*

esta OBP solo se encontró en los estados de huevo y pupa (Wu *et al.*, 2015). Esta proteína ha sido ampliamente descrita en *D. melanogaster* y se ha encontrado en otros tefrítidos, por lo que probablemente sea necesario incrementar el número de librerías o de etapas analizadas del ciclo de vida para incrementar la posibilidad de encontrarla. Otros transcritos identificados en *A. fraterculus* y *A. obliqua* por Campanini y Brito (2016) que se encuentran dentro del género y que no se identificaron en *A. ludens* fueron: OBP19b, OBP19c, OBP47b, OBP50a, OBP50e, OBP56d, OBP56h, OBP59a, OBP83cd y OBP99d. En este estudio se utilizaron tres estados reproductivos para hembras y dos para machos, por duplicado, para un total de diez librerías por especie, por lo que es probable que el incremento en el número de repeticiones permita identificar un mayor número de transcritos de los que se reportan en este estudio.

Posibles sitios de expresión de las proteínas identificada

El número de estudios de expresión en tejidos para estas proteínas es reducido y en *C. capitata* se ha encontrado que el OBP83a se expresa principalmente en antena y palpos maxilares, en cambio en *B. dorsalis* solo se expresa en antena. CcapOBP8a, CcapOBP44a, CcapOBP49a, CcapOBP56d y CcapOBP99d se expresan en órganos olfativos (sénsulos antenales y palos maxilares), y en algunas otras partes del cuerpo en ambos sexos (Siciliano *et al.*, 2014). Por el momento se puede señalar que en *A. ludens* las proteínas identificadas se encuentran en cabeza, sin embargo se requiere de estudios específicos para determinar su expresión en tejidos.

Este tipo de estudios en el manejo de la mosca mexicana de la fruta pudiera aplicarse incluso en el control de calidad de las moscas que se utilizan en la técnica del insecto estéril. En esta técnica se emplea radiación, que produce efectos laterales, los cuales pueden afectar la capacidad de las moscas de responder a olores, evitando que tengan una copulación exitosa (Bosa *et al.*, 2016; Nakamura *et al.*, 2016). Adicionalmente las OBPs al ser las primeras proteínas que intervienen en el reconocimiento de los olores son candidatos para el control de plagas de importancia. Nakamura *et al.* (2016) identificaron a AoblOBP19d-2, AoblOBP56a y AoblOBP99c como candidatos para el control de esta especie a partir de estudios con *A. fraterculus*. Estas mismas proteínas han sido identificadas en este estudio para *A. ludens*. En *A. obliqua* AoblOBP99c se expresa en mayor cantidad en machos y AoblOBP56a en hembras vírgenes, al parecer AoblOBP56a está regulado por el contacto con el esperma del macho. La expresión de este gen en machos se incrementó después de copular (Nakamura *et al.*, 2016).

Otro gen que puede ser de interés en el manejo de plagas es OBP19d-2, el cual puede estar asociado con la identificación de hospedero. En *A. ludens* se construyó una librería como un *pool* de hembras y machos jóvenes, por lo que hasta este momento no es posible detectar diferencias genes asociados al dimorfismo sexual. Sin embargo podrían buscarse candidatos con aproximaciones similares.

Con respecto a las CSPs, en trabajos como el de Wu *et al.* (2015), se identificaron 4 BdorCSPs (BdorCSP1 a BdorCSP4) y se han realizado estudios de expresión diferencial, en los que se encontró que BdorCSP3 fue la única que se presentó exclusivamente en antenas de hembras y machos en cambio BdorCSP4 se encontró en antenas, palpos, tórax, patas, abdomen y alas en ambos sexos, por lo que probablemente ocurra algo similar con la expresión en *A. ludens* debido a la similitud en la secuencia y a la cercanía de las especies. De ser este el caso AludCSP3 podría tener principalmente funciones asociadas con la percepción de olores, mientras que AludCSP4 podría intervenir en transporte de precursores feromonales. Sin embargo se requieren estudios posteriores para tener un mejor entendimiento de estos genes y sus proteínas.

Con respecto a las SNMPs, únicamente se identificó una (SNMP1), mientras en otros trabajos como el de Wu *et al.* (2015), se encontraron tres SNMPs con un alto nivel de identidad (superior al 80%) debido a que la familia CD36 se encuentra altamente conservada. En tanto que Liu *et al.* (2016) quienes también trabajaron con *B. dorsalis* identificaron 4 SNMPs correspondientes a dos genes (SNMP1 y SNMP2). En *D. melanogaster* se conocen únicamente dos SNMPs (Liu *et al.*, 2016), por lo que la presencia de una SNMP constituye una aportación significativa, sin embargo el alineamiento con secuencias de especies relacionadas indica que la secuencia de AludSNMP1 pudiera estar incompleta, puesto que sólo la región terminal se alinea con esta fracción en proteínas pertenecientes a las especies *Rhagoletis zephyria*, *Ceratitis capitata*, *B. dorsalis* y *D. melanogaster*. Sin embargo es posible observar que la similitud media de dicha sección fue elevada, 88%. Ninguna SNMP ha sido reportada hasta la fecha en *Anastrepha*. Sin embargo, esta misma proteína en ensayos con mutaciones en *D. melanogaster* demostró su importancia para regular la respuesta de un componente feromonal, incrementando la velocidad de activación e inactivación del receptor (Li *et al.*, 2014). En *B. dorsalis* se encontró que SNMP1 se expresó con mayor intensidad en antena tanto de hembras como machos y en patas. Sin embargo, en estas últimas la expresión fue mínima (Wu *et al.*, 2015). Por lo que, en *A.*

ludens, SNMP1 podría tener un papel relacionado con la respuesta feromonal de los receptores de olores.

Finalmente, los estudios sobre el olfato en insectos y en particular la identificación de OBPs a través de secuenciación de siguiente generación y análisis bioinformáticos, son cada vez más frecuentes debido a la relativa accesibilidad para obtener los datos de esta manera. Estos estudios contribuyen al entendimiento de los patrones de diversificación y de los sistemas de comunicación. El valor predictivo de estas técnicas computacionales se ha utilizado recientemente en ecología química reversa, en donde ha adquirido gran importancia y se ha empleado exitosamente para predecir semioquímicos para OBPs en tefrítidos como *B. dorsalis* (Kamala-Jayanthi *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

La mosca mexicana de la fruta *A. ludens* es una de las plagas de gran importancia para la citricultura en México. El generar información sobre las proteínas involucradas en la comunicación química de la especie puede ayudar a proponer nuevas estrategias de manejo. Los resultados de esta investigación señalan que es posible comparar las secuencias de *A. ludens* con secuencias homólogas de proteínas que intervienen en la quimiorrecepción, principalmente OBPs de especies relacionadas, mediante herramientas bioinformáticas para identificar candidatos de genes y proteínas para su uso en el manejo de plagas. En este estudio se identificaron 19 OBPs, 1 secuencia de SNMP y 2 CSPs, las cuales fueron anotadas y clasificadas. El análisis de los resultados de este trabajo señala que las secuencias obtenidas están relacionadas principalmente con dípteros, particularmente de la familia Tephritidae. En el análisis de filogenia se observó una mejor resolución al reconstruir la historia evolutiva de las proteínas con sus homólogos que cuando se al utilizar únicamente *D. melanogaster*, por lo que es probable que a medida que se tenga más información se apoye la identificación de estas proteínas en otras especies. Por otro lado, el análisis comparativo de los transcritos con especies relacionadas permitió detectar la falta de cobertura y la ausencia de algunas proteínas identificadas en especies cercanas. Debido a lo anterior se requiere de un mayor número de repeticiones para incrementar la cobertura y la exploración de diferentes condiciones que permitan profundizar en el conocimiento de la comunicación química de esta especie. Sin embargo, los resultados que aquí se presentan pueden ser la base de futuras investigaciones. Los avances recientes en el análisis transcriptómico de proteínas olfativas con técnicas de secuenciación de siguiente generación y en bioinformática permiten plantear el desarrollo de nuevas estrategias de manejo de plagas, por lo que es necesario fomentar este tipo de estudios en especies de importancia económica para México.

LITERATURA CITADA

- Aluja M., and R. L. Mangan (2008)** Fruit fly (Diptera: Tephritidae) Host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annual Review of Entomology*. 53:473–502. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093350>
- Andersson M. N., E. Grosse-Wilde, C. I. Keeling, J. M. Bengtsson, M. M. S. Yuen, M. Li, ... F. Schlyter (2013)** Antennal transcriptome analysis of the chemosensory gene families in the tree killing bark beetles, *Ips typographus* and *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *BMC Genomics* 14:198-213.
- Andrews S. (2010)** FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Bosa C. F., L. Cruz-López, C. S. Zepeda-Cisneros, J. Valle-Mora, K. Guillén-Navarro and P. Liedo (2016)** Sexual behavior and male volatile compounds in wild and mass-reared strains of the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) held under different colony management regimes. *Insect Science* 23:105-116.
- Bolger A. M., M. Lohse and B. Usadel (2014)** Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120.
- Campanini E. B. and R. A. de Brito (2016)** Molecular evolution of odorant-binding proteins gene family in two closely related *Anastrepha* fruit flies. *BMC Evolutionary Biology* 16:198-213.
- Conesa A., S. Götz, J. M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón and M. Robles (2005)** Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674–3676.
- Dickens, J. C., E. Solis and W. G. Hart (1982)** Sexual development and mating behavior of the Mexican fruit fly, *anastrepha ludens* (Loew). *The Southwestern Entomologist* 7:9-15.
- Gomulski L. M., G. Dimopoulos, Z. Xi, M. B. Soares, M. F. Bonaldo, A. R. Malacrida and G. Gasperi (2008)** Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *BMC Genomics* 9:243-257.

- Guo S. and J. Kim (2007)** Molecular Evolution of *Drosophila* Odorant Receptor Genes. *Molecular Biology and Evolution* 24:1198–1207.
- Gurevich A., V. Saveliev, N. Vyahhi and G. Tesler (2013)** QAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075.
- Grabherr M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson, I. Amit, ... A. Regev (2011)** Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29:644–652.
- Hansson B. S. and M. C. Stensmyr (2011)** Evolution of insect olfaction. *Cell Press* 72:698–711.
- Hekmat-Safe D. S., C. R. Scape, A. J. Mckinney and A. Mark (2002)** Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research* 12:1357–1369.
- Jones P., D. Binns, H. Y. Chang, M. Fraser, W. Li, C. McAnulla, ... S. Hunter (2014)** InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236–1240.
- Kamala-Jayanthi P. D., V. Kempraj, R. M. Aurade, T. K. Roy, S. K. Shivashankara. and A. Verghese (2014)** Computational reverse chemical ecology: virtual screening and predicting behaviorally active semiochemicals for *Bactrocera dorsalis*. *BMC Genomics* 15:209-215.
- Kumar S., G. Stecher and K. Tamura (2016)** MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Leitch O., A. Papanicolaou, C. Lennard, K. P. Kirkbride and A. Anderson (2015)** Chemosensory genes identified in the antennal transcriptome of the blowfly *Calliphora stygia*. *BMC Genomics* 16:255-271.
- Li Z. , J. D. Ni, J. Huang and C. Montell (2014)** Requirement for *Drosophila* SNMP1 for rapid activation and termination of pheromone-induced activity *PLoS Genetics* 10:1-12.

- Liu Z., G. Smagghe, Z. Lei and J. J. Wang (2016)** Identification of male- and female-specific olfaction genes in antennae of the Oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). *PLoS One* 11:1-19.
- Nakamura A. M., S. Chahad-Ehlers, A. L. A. Lima, C. H. Taniguti, I. Sobrinho, F. R. Torres and R. Alves de Brito (2016)** Reference genes for accessing differential expression among developmental stages and analysis of differential expression of OBP genes in *Anastrepha obliqua*. *Nature Scientific Reports* 6:17480.
- Pikielny C. W., G. Hasan, F. Rouyer and M. Rosbash (1994)** Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron* 12:35–49.
- Rambaut A (2007)** FigTree, v1.4. <http://www.tree.bio.ed.ac.uk>
- Ramsdell K. M. M., S. A. Lyons-Sobaski, H. M. Robertson, K. K. O. Walden, J. L. Feder, K. Wanner and S. H. Berlocher (2010)** Expressed sequence tags from cephalic chemosensory organs of the northern walnut husk fly, *Rhagoletis suavis*, including a putative canonical odorant receptor. *Journal of Insect Science* 10:51-61.
- Robacker D. C. (1988)** Behavioral responses of female Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens*, to components of male-produced sex pheromone. *Journal of Chemical Ecology* 14:1715–1726.
- Robacker D. C., W. C. Warfield and R. A. Flath (1992)** A four-component attractant for the mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), from host fruit. *Journal of Chemical Ecology* 18:1239–1254.
- Sachse S. and J. Krieger (2011)** Olfaction in insects. *e-Neuroforum* 2:49–60.
- Sánchez-Gracia A., F. G. Vieira and J. Rozas (2009)** Molecular evolution of the major chemosensory gene families in insects. *Heredity* 103:208–216.
- Siciliano P., F. Scolari, L. M. Gomulski, M. Falchetto, M. Manni, P. Gabrieli, ... A. R. Malacrida (2014)** Sniffing out chemosensory genes from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *PLoS One* 9:1-13.

- Thomas D. B. and J. Loera-Gallardo (1998)** Dispersal and Longevity of mass-released, sterilized Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology* 27:1045–1052.
- von-Heijne G (1986)** A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research* 14:4683–4690.
- Vosshall L. B. and R. F. Stocker (2007)** Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience* 30:505-33.
- Wu Z., H. Zhang, Z. Wang, S. Bin, H. He and J. Lin (2015)** Discovery of chemosensory genes in the Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *PLoS One* 10:1-21.
- Xu Y. L., P. He, L. Zhang, S. Q. Fang, S. L. Dong, Y. J. Zhang and F. Li (2009)** Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics* 10:632-644.
- Zheng W., W. Peng, C. Zhu, Q. Zhang, G. Saccone and H. Zhang (2013)** Identification and expression profile analysis of odorant binding proteins in the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*. *International Journal of Molecular Sciences* 14:14936–14949.

ANEXOS

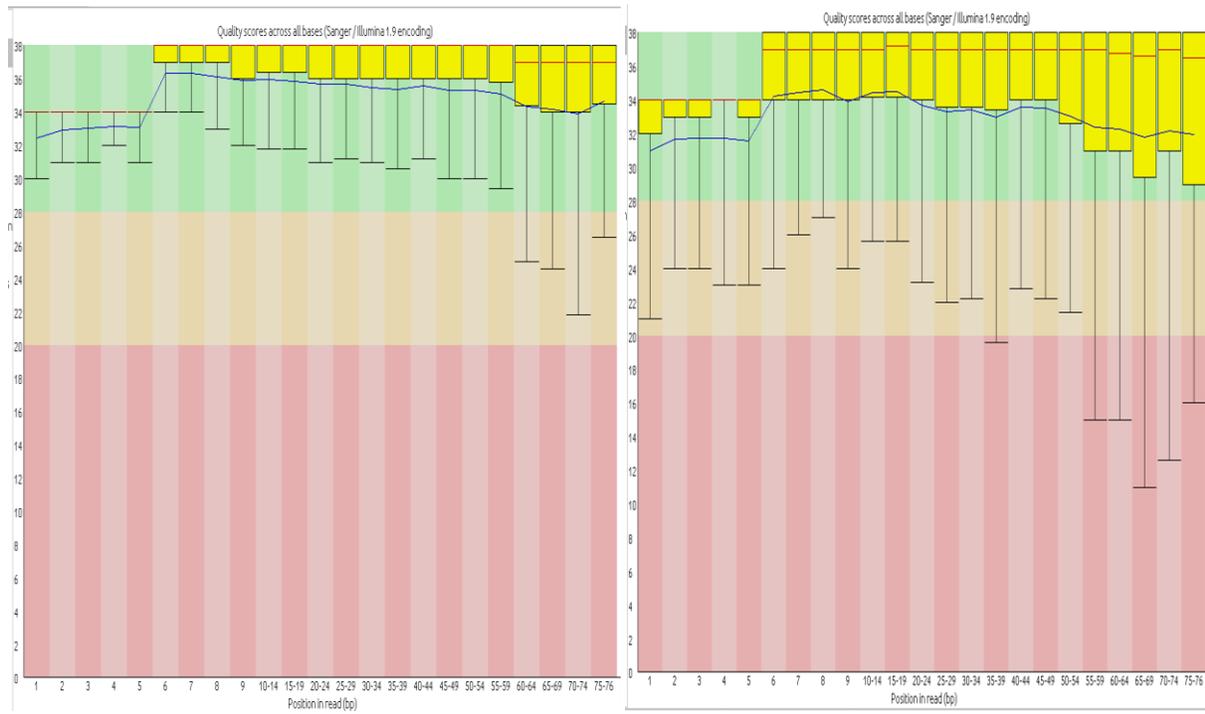
A1. Estadísticas básicas de las secuencias forward 1P y reverse 2P antes del control de calidad.

Measure	Value	Measure	Value
Filename	X01_S10_L001_R1_001.fastq	Filename	X01_S10_L001_R2_001.fastq
File type	Conventional base calls	File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9	Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	2421563	Total Sequences	2421563
Filtered Sequences	0	Filtered Sequences	0
Sequence length	35-76	Sequence length	35-76
%GC	40	%GC	40

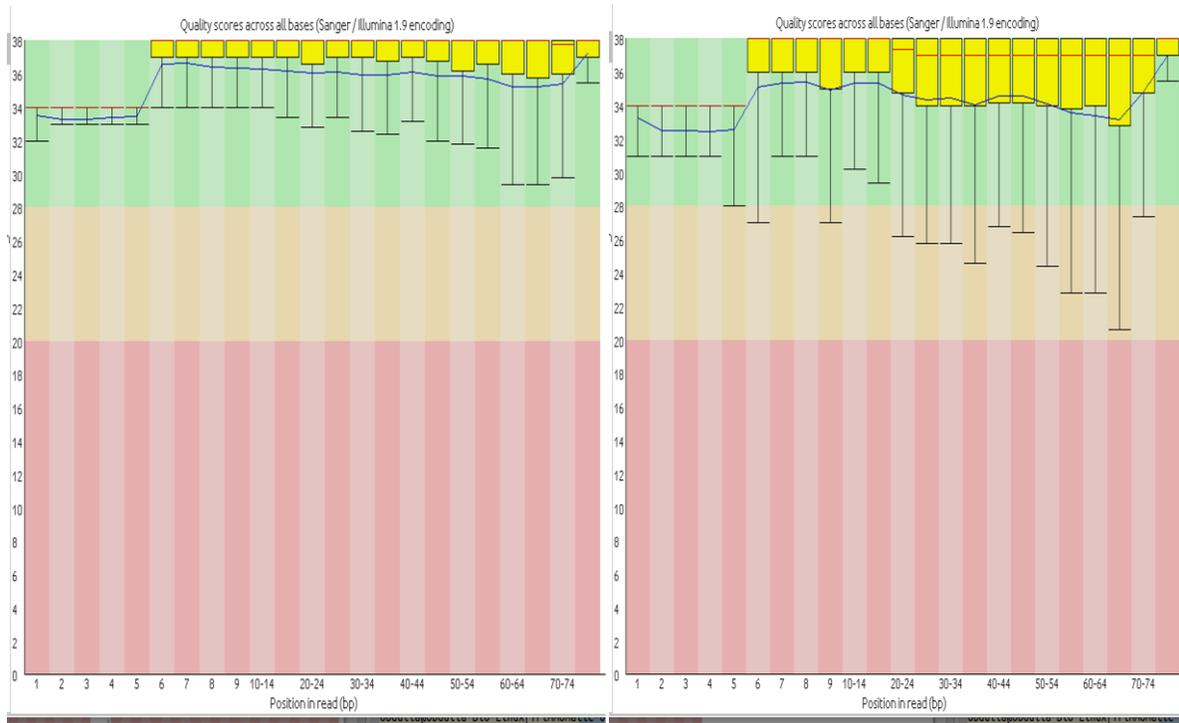
A2. Estadísticas básicas de las secuencias forward 1P y reverse 2P después del control de calidad.

Basic sequence stats		Basic sequence stats	
Measure	Value	Measure	Value
Filename	X01_trimmo_1P.fastq	Filename	X01_trimmo_2P.fastq
File type	Conventional base calls	File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9	Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	2029353	Total Sequences	2029353
Filtered Sequences	0	Filtered Sequences	0
Sequence length	70-76	Sequence length	70-76
%GC	39	%GC	39

A3. *Score* de calidad a través de todas las bases de las secuencias antes del control de calidad.
Izquierda. Lectura de forward 1P. Derecha. Lectura de reverse 2P.



A4. *Score* de calidad a través de todas las bases de las secuencias después del control de calidad. Izquierda. Lectura de forward 1P. Derecha. Lectura de reverse 2P.



A5. Números de acceso de las secuencias de OBPs analizadas.

Espece	Proteína	No. acceso	Espece	Proteína	No. acceso
<i>A. ludens</i>	OBP8a	-	<i>A. fraterculus</i>	OBP57c	AOW41546.1
<i>A. fraterculus</i>	OBP8a	AOW41536.1	<i>A. obliqua</i>	OBP57c	AOW41526.1
<i>A. obliqua</i>	OBP8a	AOW41512.1	<i>B. dorsalis</i>	OBP57c	AKI29013.1
<i>R. zephyria</i>	GOBP99a-like-X2	XP_017472959-1	<i>C. capitata</i>	GOBP57c	XP_004522856.1
<i>C. vesuviana</i>	OBP2	AMY98993.1	<i>A. ludens</i>	OBP83a-like	-
<i>A. ludens</i>	OBP19a	-	<i>C. vesuviana</i>	OBP3	AMY98994.1
<i>A. obliqua</i>	OBP19a	AOW41513.1	<i>R. zephyria</i>	PBPR6-like	XP_017493809.1
<i>R. zephyria</i>	GOBP19a-like	XP_017462172.1	<i>C. capitata</i>	OBP83a	NP_001295333.1
<i>B. dorsalis</i>	OBP19a	AKI28998.1	<i>A. ludens</i>	OBP83ef	-
<i>B. cucurbitae</i>	GOBP19a	XP_011187213.1	<i>A. obliqua</i>	OBP83ef	AOW41529.1
<i>A. ludens</i>	OBP19d	-	<i>A. fraterculus</i>	OBP83ef	AOW41549.1
<i>B. oleae</i>	GOBP19d-like	XP_014090132.1	<i>B. dorsalis</i>	OBP83ef	AKI29018.1
<i>B. cucurbitae</i>	GOBP19d-like	XP_011187246.1	<i>G. morsitans</i>	OBP3	CBA11307.1
<i>A. ludens</i>	OBP19d-like-1	-	<i>morsitans</i>		
<i>A. fraterculus</i>	OBP19d	AOW41539.1	<i>A. ludens</i>	OBP83g	-
<i>A. obliqua</i>	OBP19d	AOW41516.1	<i>A. fraterculus</i>	OBP83g	AOW41550.1
<i>R. zephyria</i>	GOBP19d-like	XP_017468799.1	<i>A. obliqua</i>	OBP83g	AOW41530.1
<i>A. ludens</i>	OBP19d-like-2	-	<i>B. cucurbitae</i>	OBR2	AMH85963.1
<i>C. capitata</i>	GOBP19d-like	XP_004525139.1	<i>C. capitata</i>	GOBP99a	XP_004523508.1
<i>B. oleae</i>	GOBP19d-like-2	XP_014090156.1	<i>A. ludens</i>	OBP84a-like	-
<i>B. tau</i>	GOBP19d	AKN10577.1	<i>B. cucurbitae</i>	GOBP84a-like	XP_011184805.1
<i>A. ludens</i>	OBP28a-like	-	<i>B. oleae</i>	GOBP84a-like	XP_014097710.1
<i>R. zephyria</i>	GOBP28a-like	XP_017469008.1	<i>C. capitata</i>	GOBP84a-like	XP_012158643.1
<i>B. oleae</i>	GOBP28a-like	XP_014095310.1	<i>A. ludens</i>	OBP99a-like	-
<i>B. cucurbitae</i>	GOBP28a-like	XP_011193147.1	<i>A. fraterculus</i>	OBP99c	AOW41553.1
<i>A. ludens</i>	OBP49a	-	<i>A. obliqua</i>	OBP99c	AOW41533.1
			<i>R. zephyria</i>	GOBP99a	XP_017464529.1

A5 (continuación). Números de acceso de las secuencias de OBPs analizadas.

Especie	Proteína	No. acceso	Especie	Proteína	No. acceso
<i>A. fraterculus</i>	OBP49a	AOW41541.1	<i>B. cucurbitae</i>	GOBP99a-like	XP_011184698.1
<i>A. obliqua</i>	OBP49a-1	AOW41518.1	<i>A. ludens</i>	OBP99b	-
<i>R. zephyria</i>	GOBP68-like	XP_017460912.1	<i>A. fraterculus</i>	OBP99b	AOW41552.1
<i>B. dorsalis</i>	OBP50e	AKI29007.1	<i>A. obliqua</i>	OBP99b	AOW41532.1
<i>A. ludens</i>	OBP50c	-	<i>C. capitata</i>	GOBP99a-2	XP_004521183.1
<i>A. obliqua</i>	OBP50a	AOW41520.1	<i>R. zephyria</i>	GOBP99b	XP_017472956.1
<i>A. fraterculus</i>	OBP50a-1	AOW41556.1	<i>A. ludens</i>	OBP99c	-
<i>A. fraterculus</i>	OBP50a-2	AOW41557.1	<i>A. fraterculus</i>	OBP99a-like	AMB61034.1
<i>B. dorsalis</i>	OBP50c	AKI29006.1	<i>C. capitata</i>	GOBP99a-3	XP_004521186.1
<i>A. ludens</i>	OBP56a-1	-	<i>D. bipectinata</i>	GOBP99a	XP_017100048.1
<i>A. fraterculus</i>	OBP56a-like	AMB61033.1	<i>D.</i>	OBP99c	ABW78556.1
			<i>melanogaster</i>		
<i>R. zephyria</i>	GOBP56a-like	XP_017479701.1	<i>A. ludens</i>	OS-F	-
<i>C. capitata</i>	GOBP56a-like- X1	XP_004517900.1	<i>B. dorsalis</i>	PBPR6	XP_011212461.1
<i>B. cucurbitae</i>	OBR	AMH85959.1	<i>B. cucurbitae</i>	PBPR6	XP_011191644.1
<i>A. ludens</i>	OBP56a-2	-	<i>C. capitata</i>	PBPR6	XP_004523445.1
<i>B. dorsalis</i>	OBP56a	AKI29008.1	<i>D.</i>	OBP83a-C	NP_001287190.1
			<i>melanogaster</i>		
<i>A. ludens</i>	OBP57c-like	-			

A6. Números de acceso de las secuencias de CSPs y SNMPs analizadas.

Especie	Proteína	No. acceso	Especie	Proteína	No. acceso
<i>A. ludens</i>	CSP3	-	<i>C. stygia</i>	CSP	AID61323.1
<i>B. cucurbitae</i>	A10-X2	XP_011177223.1	<i>D. melanogaster</i>	CSP1	NP_726402.1
<i>B. oleae</i>	A10-X2	XP_0140087038.1	<i>A. ludens</i>	SNMP1	-
<i>B. dorsalis</i>	A10-X2	XP_011208559.1	<i>R. zephyria</i>	SNMP1	XP_017492152.1
<i>D. melanogaster</i>	OS-D	AAA21358.1	<i>C. capitata</i>	SNMP1	XP_004519545.1
<i>A. ludens</i>	CSP4	-	<i>B. oleae</i>	SNMP1	XP_014103416.1
<i>B. dorsalis</i>	CSP4	AKI28978.1	<i>D. melanogaster</i>	SNMP1-A	XP_001979326.1
<i>G. morsitans</i>	CSP5	CBA11331.1			
<i>morsitans</i>					

A7. Alineamiento de OBPs de *A. ludens* con homólogos en otras especies.

```

AludOBP8a
AfraOBP8a
AobLOBP8a
RzepGOBP99a-like-X2
CvesOBP2
AludOBP19a
AobLOBP19a
RzepGOBP19a-like
BdorOBP19a
BcucGOBP19a
AludOBP19d
BoleGOBP19d-like
BcucGOBP19d-like
AludOBP19d-like-1
AfraOBP19d
AobLOBP19d
RzepGOBP19d-like
AludOBP19d-like-2
CcapGOBP19d-like
BoleGOBP19d-like
BtauGOBP19d
AludOBP28a-like
RzepGOBP28a-like
BoleGOBP28a-like
BcucGOBP28a-like
AludOBP49a
AfraOBP49a
AobLOBP49a-1
RzepGOBP68-like
BdorOBP50e
AludOBP50c
AobLOBP50a
AfraOBP50a-1
AfraOBP50a-2
BdorOBP50c
AludOBP56a-1
AfraOBP56a-like
RzepGOBP56a-like
CcapGOBP56a_isoform_X1
BcucOBR
AludOBP56a-2
BdorOBP56a
AludOBP57c-like
AfraOBP57c
AobLOBP57c
BdorOBP57c
CcapGOBP57c
AludOBP83a-like
CvesOBP3
RzepPBR_6-like
CcapOBP83a
AludOBP83ef
AobLOBP83ef
AfraOBP83ef
BdorOBP83ef
GmorOBP3
AludOBP83g
AfraOBP83g
AobLOBP83g
BcucOBR
CcapGOBP99a
AludOBP84a-like
BcucGOBP84a-like
BoleGOBP84a-like
CcapGOBP84a-like
AludOBP99a-like
AfraOBP99c
AobLOBP99c
RzepGOBP99a
BcucGOBP99a-like
AludOBP99b
AfraOBP99b
AobLOBP99b
CcapGOBP99a
RzepGOBP99b
AludOBP99c
AfraOBP99a-like
CcapGOBP99a
DbipGOBP99a
DmelOBP99c
AludOBP_OS-F (OBP83a)
BdorPBR6
BcucPBR6
CcapPBR6-like
DmelOBP83a-C
CGQNMKATVIFVFLICVFGGRYASADD
MKATVIFVFLICVFGGRYASADD
MKATVIFVFLICVFGGRYASADD
MKASFVYFAVICVFVHYANAQDT
MKAYFGYFVVIFVFCVHASADD
MKCLVSLLLLAALLGVNAYEFDDSTFNEYLFKELQSLQDDDIADDLPTHRRARRETE
MKFLVSLLLLAALLGVNAYEFDDSTFNEYLLKELQSLQVDDTGDALPTHRRARRETE
MKCFLVFLLLFVLLCVNAYDFDDSAFNEYLFKELQSHYEEDE
VSHRTRREAA
PTQKNQVKTRTFMSKPNNSNEMNFCEASYMFLLIATAICMQMVSSASTTKALSAMTASQ
MVSSASTTKALSAMTASQ
MVSSASTTKALSAMTASQ
MNFREASQVLLIAYAYCIQMVSSAATTKA
AEQ

```

A7 (Continuación). Alineamiento de OBPs de *A. ludens* con homólogos en otras especies.

	1	10	20
AludOBP8a	EMRSTT	LAFIVFLF	TFDAFSA
AfraOBP8a	MRSTT	LAFIVFLF	TFDAFSA
AoblOBP8a	MRSTT	LAFIVFLF	TFDAFSA
RzepGOBP99a-like-X2	MKRITL	LAYIIFLF	TFCMPLIS
CvesOBP2	MKRITL	LAFIILLF	TFCMLIS
AludOBP19a			
AoblOBP19a	MSRKL	IFCILLT	VFIILVLQVTRISGG
RzepGOBP19a-like			
BdorOBP19a	MLNK	INSFVLAT	VFIALVVLHSDQVSGG
BcucGOBP19a	MSNK	INLFLVAV	VFIALVLRSDQVFGG
AludOBP19d			
BoleGOBP19d-like	KMKY	LVFLVIC	LAI SYAE
BcucGOBP19d-like	MKYF	LVFLAICS	LVI SFSE
AludOBP19d-like-1			
AfraOBP19d	MTAF	SCFLIF	ITMTS
AoblOBP19d	MTAF	SCFLIF	ITMTS
RzepGOBP19d-like	MNFT	VEVRELLFINLVRIC	GMRVLSVLTICLAI
AludOBP19d-like-2			
CcapGOBP19d-like	MEIP	KFFFFI	AIITGSKM
BoleGOBP19d-like	MEIL	IILPILAV	SSVFIKMAA
BtauGOBP19d			
AludOBP28a-like			
RzepGOBP28a-like	MAKL	VLIGAF	FCILNAAVSKA
BoleGOBP28a-like	MAKE	ILFAAF	FCILSAAVSKA
BcucGOBP28a-like	MAKE	ILIAAL	FCILSAAVTKA
AludOBP49a	ASVD	CTKPRRHIPPHMCCP	VPDLSTDELMKQC
AfraOBP49a	ASVD	CTKPRRHIPPHMCCP	VPDLSTDELMKQC
AoblOBP49a-1	ASVD	CTKPRRHIPPHMCCP	VPDLSTDELMKQC
RzepGOBP68-like	TSVD	CTKPRRHVPPHMCCP	VPDLTDELMKQC
BdorOBP50e	ETVD	CTKPRFVPPHMCCP	VPDVSTDELKQC
AludOBP50c	VENSAE	KEAKECAKHNWKKDMHCC	KGSNVNDEQLELF
AoblOBP50a	VEHSAE	KDAKECAKHTWKKDMHCC	KGSNVNDEQLELF
AfraOBP50a-1			
AfraOBP50a-2			
BdorOBP50c	DAN		
AludOBP56a-1			
AfraOBP56a-like	IMKST	ISCCILATVLL	CLCATSTDAFGRKPKKLNPELE
RzepGOBP56a-like			
CcapGOBP56a_isoform_X1	MKSL	FIVCCMLATL	LISFCVLTSEAGLRKPKKLTPELE
BcucOBR	MKSSI	ICMLATVLL	SLCVFSADAGLRKPKKLTPELE
AludOBP56a-2	IMKST	ISCCILATVLL	CLCATSTDAFGRKPKKLNPELE
BdorOBP56a	MKSSI	ICMLATVLL	SLCVFNADAGLRKPKKLTPELE
AludOBP57c-like	RGEM		
AfraOBP57c	MYQF	GVDRENATERGEM	
AoblOBP57c	MYQF	GMDRENATERGEM	
BdorOBP57c	MYQF	GAHEKRATTTATMSATVLA	AAGGGKGSIPGLTWLVLLAVIVVFALPPG
CcapGOBP57c	MFQF	GEVGNKNTT	TKSEMMLASNGRGM
AludOBP83a-like			
CvesOBP3	MPQM	YFLKIL	GLTFLFSCYLLSTANAQKELRRD
RzepPBR6-like	MHKMY	SLKMLL	GLTFLFSCYLLSMAKAQKELRRD
CcapOBP83a	MY	ILRTIL	GALLWCSVLLNLIWAQKELRRD
AludOBP83ef	NADTDTE	ILRKCLREVGSKDLVG	ELQKVARYSKWTKEEIPCFTRCLAAEKRWFPDAGE
AoblOBP83ef	NADTDTE	ILRKCLREVGSKDLVG	ELQKVARYSKWTKEEIPCFTRCLAAEKRWFPDAGE
AfraOBP83ef	NADTDTE	ILRKCLREVGSKDLVG	ELQKVARYSKWTKEEIPCFTRCLAAEKRWFPDADK
BdorOBP83ef	DVSDTE	ILRKCLREVGSKDLVG	ELQKVARYSKWTSEEVPCFTRCLASMKHWFDADE
GmorOBP3	NSEI	LRKCFEEDQSQYNSSEV	LLEKFKNYAYWSHEEIPCFARCIASEKGFWDIDL
AludOBP83g	MKQL	LILLLAC	VALAA
AfraOBP83g	MKQL	LILLLAC	VALAA
AoblOBP83g	MKQL	LILLLAC	VALAA
BcucOBR	MKTQ	LILLLAC	VALV
CcapGOBP99a	MKIQ	LILLLAC	VALVA
AludOBP84a-like	SNRR	SWMELKISKMATCRYRYR	YLDIVVSLIIVVAISFTYAQTNSKNNGVDEQPSIEMT
BcucGOBP84a-like	MSELLE	MVNYR	KVELALSLLLGLVLAGTADADQSDATDNKLDKQSQSMETT
BoleGOBP84a-like			
CcapGOBP84a-like	MGIT	CKLLKKTMLDHRHLNI	ILLLLQFGIMSSGAADAQTNLTNNASDQLQAVENT
AludOBP99a-like	KIKMKY	F	IAILAIVALAHAE
AfraOBP99c	MKYF	I	IAILAIVALAHAE
AoblOBP99c	MKYF	I	IAILAIVALAHAE
RzepGOBP99a	MKYF	I	IAILAVVALAQAE
BcucGOBP99a-like	MKFF	I	IVLAVVALAYAE
AludOBP99b	SFALL	HTLQRIMKFF	IAAFSLIALVLADHDHDPHAGH
AfraOBP99b	MKFF	I	IAFSLIALVLADHDHDPHAGH
AoblOBP99b	MKFF	I	IAFSLIALVLADHDHDPHAGH
CcapGOBP99a	MKFL	ALLSLF	FVVVADHG
RzepGOBP99b	MKYF	I	IAFSLIAVVVLAHDS
AludOBP99c	NMKFY	VVLTAL	FGLVFAE
AfraOBP99a-like			
CcapGOBP99a	MKFL	I	IVVLAVALAYAD
DbipGOBP99a	MLKFL	LIVLAL	CVAFA
DmelOBP99c	MLKY	LIVLAL	CAVAHAD
AludOBP_OS-F (OBP83a)	MVLN	GIWRAQAFYVFL	IVALSSSLTLMH
BdorPBR6	MVLT	GTRRGAQAFHAF	LIVALSSSLTLMH
BcucPBR6	MVLN	GILRGHPLSAFL	IVALASSSLTLVH
CcapPBR6-like	MALN	GSRRSQAFNAFL	IVALASSSLTLMHVVAQEPFRD
DmelOBP83a-C	MDQE	GPRS	SGKERNGKSHIKMALNGFGRVRSASVLLI

A7 (Continuación). Alineamiento de OBPs de *A. ludens* con homólogos en otras especies.

	30	40
AludOBP8a	ADFE	EDFL
AfraOBP8a	ADFE	EDFL
AoblOBP8a	ADFE	EDFL
RzepGOBP99a-like-X2	ADFE	EDFL
CvesOBP2	ADFE	EDFL
AludOBP19a	ATEE	QMI
AoblOBP19a	ATEE	QMI
RzepGOBP19a-like	ATEE	QMI
BdorOBP19a	ATEE	QMI
BcucGOBP19a	ATEE	QMI
AludOBP19d	GQEL	LQK
BoleGOBP19d-like	AEEF	LQK
BcucGOBP19d-like	AQEL	LQK
AludOBP19d-like-1	LRAM	TEA
AfraOBP19d	LRAM	TEA
AoblOBP19d	LRAM	TEA
RzepGOBP19d-like	LRTM	AEA
AludOBP19d-like-2	AQDI	QK
CcapGOBP19d-like	LRLM	AEA
BoleGOBP19d-like	LLVM	AEA
BtauGOBP19d	AQEL	LQK
AludOBP28a-like	KEEA	IKQ
RzepGOBP28a-like	KEEA	IKQ
BoleGOBP28a-like	KEEA	IKQ
BcucGOBP28a-like	KEEA	IKQ
AludOBP49a	QPHP	PHG
AfraOBP49a	QPHP	PHG
AoblOBP49a-1	QPHP	PHG
RzepGOBP68-like	RGHP	PHG
BdorOBP50e	FDRR	HHPH
AludOBP50c	NCDK	MQQV
AoblOBP50a	NCDK	MQQV
AfraOBP50a-1	NCDK	MQQV
AfraOBP50a-2	NCDK	MQQV
BdorOBP50c	DCEK	MQQV
AludOBP56a-1	AKFD	VLT
AfraOBP56a-like	AKFD	VLT
RzepGOBP56a-like	AKFD	VLT
CcapGOBP56a_isoform_X1	AKFD	VLT
BcucOBR	AKFD	VLT
AludOBP56a-2	AKFD	VLT
BdorOBP56a	AKFD	VLT
AludOBP57c-like	RVTI	ATPT
AfraOBP57c	RVTI	ATPT
AoblOBP57c	RVTI	ATPT
BdorOBP57c	AVAL	TPT
CcapGOBP57c	KVA	ASPT
AludOBP83a-like	DTY	PPPA
CvesOBP3	ETY	PPPA
RzepPBR_6-like	ETY	PPPE
CcapOBP83a	ETY	PPPE
AludOBP83ef	SKW	IKQ
AoblOBP83ef	SKW	IKQ
AfraOBP83ef	SKW	IKQ
BdorOBP83ef	SKW	IKQ
GmorOBP3	SRW	NKQ
AludOBP83g	AKF	QLR
AfraOBP83g	AKF	QLR
AoblOBP83g	AKF	QLR
BcucOBR	GKFE	LIR
CcapGOBP99a	GKFE	LIR
AludOBP84a-like	TAM	ADDG
BcucGOBP84a-like	TPMA	AAA
BoleGOBP84a-like	TPSV	AAA
CcapGOBP84a-like	TPM	VEEE
AludOBP99a-like	DEW	KVK
AfraOBP99c	DEW	KVK
AoblOBP99c	DEF	TVK
RzepGOBP99a	EEW	NVK
BcucGOBP99a-like	DDW	VPK
AludOBP99b	SDY	VVK
AfraOBP99b	SDY	VVK
AoblOBP99b	SDY	VVK
CcapGOBP99a	ADY	VVK
RzepGOBP99b	ADY	VVK
AludOBP99c	EQV	KSI
AfraOBP99a-like	AEV	KSI
CcapGOBP99a	DEW	TVK
DbipGOBP99a	.EW	QPK
DmelOBP99c	.DW	TPK
AludOBP_OS-F(OBP83a)	DKW	PPPA
BdorPBR6	DKW	PPPA
BcucPBR6	DKW	PPPA
CcapPBR6-like	DKW	PPPA
DmelOBP83a-C	ENY	PPPG

A7 (Continuación). Alineamiento de OBPs de *A. ludens* con homólogos en otras especies.

	50	60	70	80	90
AludOBP8a	...PSSYQRRFDNFEYPDEEIV	HRYVH	CIWKKLE	LWNR	RTG.FNV
AfraOBP8a	...PSSYQRRFDNFEYPDEEIV	HRYVH	CIWKKLE	LWNR	RTG.FNV
AoblOBP8a	...PSSYQRRFDNFEYPDEEIV	HRYVH	CIWKKLE	LWNR	RTG.FNV
RzepGOBP99a-like-X2	...PASVQRRFDNFDYPNEEPV	HRYVH	CIWTELE	LWNR	RTG.FNV
CvesOBP2	...PASVQRRFDNFDYPNEEPV	HRYVH	CIWTELE	LWNR	RTG.FNV
AludOBP19a	...GIK...LGNVPDTKDVK.	CYIN	CVEMM	TMKKGKFLLES.	SLKQV
AoblOBP19a	...GIK...LGNVPDTKDVK.	CYIN	CVEMM	TMKKGKFLLES.	SLKQV
RzepGOBP19a-like	...GIK...LGNVPDTKDVK.	CYIN	CVLEMM	TMKKGKFLLES.	SLKQV
BdorOBP19a	...GIK...EGNVPDTKDVK.	CYIN	CIMEMM	TMKKGKFLYES.	ALKQI
BcucGOBP19a	...GIK...EGKVPDTKDVK.	CYIN	CVEMM	TMKKGKFLYES.	SLKQV
AludOBP19d	...DADIEALFKHEPAANDKAK	CLNA	CIMKMM	GLVDAGAKLNEDA	ASNLKVAEGDAN
BoleGOBP19d-like	...DEDVAGVFKYEPAAANDKAK	CLNA	CCMQKLG	ILDENHKLVEAGAI	EYIKQVLAAGDAE
BcucGOBP19d-like	...DDDVTRMLKYEPATNDKAK	CLQA	CIMKQFG	ILDDNNKLVEAGAM	YIKSLAAGDAE
AludOBP19d-like-1	...ELL...KGS.RDNLHNT	KCLRY	CIMRKN	GLFNASNSLDKEK	LVDIFEIHPQVEK
AfraOBP19d	...ELL...KGS.RDNLHNT	KCLRY	CIMRKN	GLFNASNSLDKEK	LVDIFEIHPQVEK
AoblOBP19d	...ELL...KGS.RDNLHNT	KCLRY	CIMRKN	GLFNASNSLDKEK	LVDIFEIHPQVEK
RzepGOBP19d-like	...ELL...KGS.RDNLHNT	KCLRY	CIMRKN	GLFNASNSLDKEK	LVDIFEIHPQVEK
AludOBP19d-like-2	...DADIDALLKHQPAGSDKAK	CLMT	CFMKNF	GLIDAGAKIDQDS	VALNVIKAVANGDAN
CcapGOBP19d-like	...ELL...KGS.RDNLHNT	KCLRY	CIMRKN	GLLNELNSVDEEK	LIQIFLIHPQIER
BoleGOBP19d-like	...EIL...KGS.RDNLHNT	KCLRY	CIMRKN	GLLNIDNSIDEEN	LIQIFLIHPQVEK
BtaugGOBP19d	...DDDVTRMLKYEPATNDKAK	CLQA	CIMKQFG	ILDDNNKLVEAGAM	YIKSLAAGDAE
AludOBP28a-like	...SSDIEELVKKLPATSGKEG	KCLRA	CLMKKY	GVMMDDGGKFITA	...EIVGG
RzepGOBP28a-like	...ASDIEDLTKKAPAAASKEG	KCLRS	CMMKKY	GVMDGGKFVKSVA	LEHASTFTDGDAD
BoleGOBP28a-like	...DSDIQDLIAKVPAAGKEG	KCLRS	CLMKKY	GVAMDNGKFVKSVA	LEHASTFTDGDAD
BcucGOBP28a-like	...DSDIQDLIAKVPAAGKEG	KCLRS	CLMKKY	GVAMDNGKFVKSVA	LEHASTFTDGDAD
AludOBP49a	...GELNQDKFKELLATAVKDNE	EEMA	AVMEE	SFQTCIEKATEMKT	KIADKISKDPEFAEK
AfraOBP49a	...GELNQDKFKELLATAVKDNE	EEMA	AVMEE	SFQTCIEKATEMKT	KIADKISKDPEFAEK
AoblOBP49a-1	...GELNQDKFKELLATAVKDNE	EEMA	AVMEE	SFQTCIEKATEMKT	KIADKISKDPEFAEK
RzepGOBP68-like	...GELNADKFEQLLNTVKNDD	REMA	IIIMKE	SFNACSAKANELKTI	AEIEIKNPEFSK
BdorOBP50e	...GEPDVKFSAALLDTAVKDN	EEMA	AVMEE	SFESCVGMLSELKAK	MAEKASKHPEFADR
AludOBP50c	...GQFKRDVILEQLRKQIGDV	QWK	KDAIE	GYVDDKCLAEVKEK	...EQLKAGKLS
AoblOBP50a	...GQFKRDVILEQLRKQIGDV	QWK	KDAIE	GYVDDKCLAEVKEK	...EQLKAGKLS
AfraOBP50a-1	...GQFKRDVILEQLRKQIGDV	QWK	KDAIE	GYVDDKCLAEVKEK	...EQLKAGKLS
AfraOBP50a-2	...GQFKRDVILEQLRKQIGDV	QWK	KDAIE	GYVDDKCLAEVKEK	...EQLKAGKLS
BdorOBP50c	...GELQRDVILEQLRKQIGDV	QWK	KDAIE	GYVDDKCLAEVKEK	...EQLKAGKLS
AludOBP56a-1	...DELATNLVKIKVANPNDR	E	KCYVN	CLYTKLVFYKNN	SINTQAMKESLS
AfraOBP56a-like	...DELATNLVKIKVANPNDR	E	KCYVN	CLYTKLVFYKNN	SINTQAMKESLS
RzepGOBP56a-like	...DQLATSLVKVQVANSDRE	E	KCYVN	CLYTKLVFYKNN	SINTQAMKESLS
CcapGOBP56a_isoform_X1	...DELATNLVKIKVANPNDR	E	KCYVN	CLYTKLVFYKNN	SINTQAMKESLS
BcucOBR	...DELATNLVKIKVANPNDR	E	KCYVN	CLYTKLVFYKNN	SINTQAMKESLS
AludOBP56a-2	...DELATNLVKIKVANPNDR	E	KCYVN	CLYTKLVFYKNN	SINTQAMKESLS
BdorOBP56a	...DELATNLVKIKVANPNDR	E	KCYVN	CLYTKLVFYKNN	SINTQAMKESLS
AludOBP57c-like	...ELP...DDPNPEDIDMKY	KCYAN	CLLNLG	GFMDENGKLNAE	MMHDA
AfraOBP57c	...ELP...DDPNPEDIDMKY	KCYAN	CLLNLG	GFMDENGKLNAE	MMHDA
AoblOBP57c	...ELP...DDPNPEDIDMKY	KCYAN	CLLNLG	GFMDENGKLNAE	MMHDA
BdorOBP57c	...EFP...TDPSPEDIDMKY	KCYAD	CLLNLG	GFMDENGKLNAE	MMHDA
CcapGOBP57c	...EFP...TDPSPEDIDMKY	KCYAD	CLLNLG	GFMDENGKLNAE	MMHDA
AludOBP83a-like	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMY	CVFEE	TDVLHDDGEVHLEK	ILDSLP...QSMHD
CvesOBP3	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMY	CVFEE	TDVLHDDGEVHLEK	ILDSLP...QSMHD
RzepPBP6-like	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMY	CVFEE	TDVLHDDGEVHLEK	ILDSLP...QSMHD
CcapOBP83a	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMY	CVFEE	TDVLHDDGEVHLEK	ILDSLP...QSMHD
AludOBP83ef	NELNVTMEELQKYAAPPSEKVV	PCLFQ	CLAKKM	NFYTHTYE.WNPNVVKAF	GFPMR..QN
AoblOBP83ef	NELNVTMEELQKYAAPPSEKVV	PCLFQ	CLAKKM	NFYTHTYE.WNPNVVKAF	GFPMR..QN
AfraOBP83ef	NELNVTMEELQKYAAPPSEKVV	PCLFQ	CLAKKM	NFYTHTYE.WNPNVVKAF	GFPMR..QN
BdorOBP83ef	NELNVTMEELQKYAAPPSEKVV	PCLFQ	CLAKKM	NFYTHTYE.WNPNVVKAF	GFPMR..QN
GmorOBP3	KEKSIQMDQLLEYHFPQLEHI	PCLFK	CFADK	SHLYTVNKE.WNVLNWLKAF	GFPIR..NE
AludOBP83g	...PEDIYQKYLNYEFPFHRT	NCYVK	CFVEK	MGLFTEKKG.FDEKAI	IAQFTAKSSKNL
AfraOBP83g	...PEDIYQKYLNYEFPFHRT	NCYVK	CFVEK	MGLFTEKKG.FDEKAI	IAQFTAKSSKNL
AoblOBP83g	...PEDIYQKYLNYEFPFHRT	NCYVK	CFVEK	MGLFTEKKG.FDEKAI	IAQFTAKSSKNL
BcucOBR	...PEDIYQKYLNYEFPFHRT	NCYVK	CFVEK	MGLFTEKKG.FDEKAI	IAQFTAKSSKNL
CcapGOBP99a	...PDDIYQKYLNYEFPFHRT	NCYVK	CFVER	MGLFTEKKG.FDEKAI	IAQFTAKSSKNL
AludOBP84a-like	...YMQRFNETAELPNTTDTKT	GMCFM	CYME	NAGLLR.NWQLNRA	...LIMQTMWPATGD
BcucGOBP84a-like	...YMQRFNETAELPNTTDTKT	GMCFM	CYME	NAGLLR.NWQLNRA	...LIMQTMWPATGD
BoleGOBP84a-like	...YIQRFNETAELPNTTDTKT	GMCFL	CYME	NAGLLR.NWQLNST	...LIRQTMWPATGD
CcapGOBP84a-like	...YIQRFNETAELPNTTDTKT	GMCFL	CYME	NAGLLR.NWQLNST	...LIRQTMWPATGD
AludOBP99a-like	...SEEDIQKMKNFYEPDEEPV	RKYLL	CTAKK	LGIFFCAHEG.YHADRVAKQ	FKMDL..DE
AfraOBP99c	...SEEDIQKMKNFYEPDEEPV	RKYLL	CTAKK	LGIFFCAHEG.YHADRVAKQ	FKMDL..DE
AoblOBP99c	...SEEDIQKMKNFYEPDEEPV	RKYLL	CTAKK	LGIFFCAHEG.YHADRVAKQ	FKMDL..DE
RzepGOBP99a	...SQEYIQKMKNFYEPDEEPV	RKYLL	CTAKK	LGIFFCAHEG.YHADRVAKQ	FKMDL..DE
BcucGOBP99a-like	...SEEYIQKMKNFYEPDEEPV	RKYLL	CTAKK	LGIFFCAHEG.YHADRVAKQ	FKMDL..DE
AludOBP99b	...PDDLVEKYRKYWEYPPDEKS	RCFLK	CIFE	QFGLYDDEKGF.DIHKIH	HQLEGDKVDHS
AfraOBP99b	...PDDLVEKYRKYWEYPPDEKS	RCFLK	CIFE	QFGLYDDEKGF.DIHKIH	HQLEGDKVDHS
AoblOBP99b	...PDDLVEKYRKYWEYPPDEKS	RCFLK	CIFE	QFGLYDDEKGF.DIHKIH	HQLEGDKVDHS
CcapGOBP99a	...PADLVEKYRKYWEYPPDEKS	RCYLK	CVLE	SFGLFDDEKGF.FDVHKV	HQLEGDKVDHS
RzepGOBP99b	...ADDLVEKYRKYWEYPPDEKS	RCYLK	CIFE	ELGLYDDEKGF.FDVHKV	HQLEGDKVDHS
AludOBP99c	...ASKYFVNLLNLEYPDPEV	HSYMD	CVAD	KLGLWDFKTGQPNVER	LAFFSVDP..NN
ASEYFVNLLNLEYPDPEV	HSYMD	CVAG	KLGLWDFKTGQPNVER	LAFFSVDP..NN	
AfraOBP99a-like	...GDEYIQKMKNFYEPDEEPV	RKYLL	CTAKK	LGIFFCAHEG.YHADRVAKQ	FKMDL..DE
CcapGOBP99a	...SNDQVQKQLKLVFDEPEV	RKYLE	CTA	TKLEIFCTVEG.YHADRVAKQ	FKMDL..TE
DmelOBP99a	...SNDQVQKQLKLVFDEPEV	RKYLE	CTA	TKLEIFCTVEG.YHADRVAKQ	FKMDL..TE
AludOBP_OS-F(OBP83a)	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMN	CLFHE	IDVDDNGDVHLE	TLFNTV...GTVRD
BdorPBP6	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMN	CLFHE	IDVDDNGDVHLE	TLFNTV...GTVRN
BcucPBP6	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMN	CLFHE	IDVDDNGDVHLE	TLFNTV...GTVRN
CcapPBP6-like	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMN	CLFHE	IDVDDNGDVHLE	TLFNTV...GTVRD
DmelOBP83a-C	...EEAIKEFSDGQVHE.DEAL	KCYMN	CLFHE	IDVDDNGDVHLE	TLFNTV...LSMRD

A7 (Continuación). Alineamiento de OBPs de *A. ludens* con homólogos en otras especies.

	100	110	120	130	140
AludOBP8a	EVLPVILSDCN	RN.AQNESK	LKWCYDAFK	CMLDSRVG	QWFKEDVGRK
AfraOBP8a	EVLPVILSDCN	RN.AQNESK	LKWCYDAFK	CILNSRVG	QWFKEDVGRK
AoblOBP8a	EVLPVILSDCN	RN.AQNESK	LKWCYDAFK	CILNSRVG	QWFKEDVGRK
RzepGOBP99a-like-X2	EVLPVILSDCN	RN.AQNEPT	LKWCYDAFK	CVLNSRVG	QWFKEDVGRK
CvesOBP2	EVLPVILSDCN	RN.TONEPT	LKWCYDAFK	CVLNSRVG	QWFKEDVGRK
AludOBP19a	DEYRNLGNTNCKDAA	NGIKNN	CDASYALLI	CMR	DQIKKFMFP
AoblOBP19a	DEYRNLGNTNCKDAA	NGIKNN	CDASYALLI	CMR	DQIKKFMFP
RzepGOBP19a-like	DDYRAGLQTKDAAV	NGIKNN	CDASYALLI	CIR	GEIKRFIFP
BdorOBP19a	DDYRNLGAKCKDVT	SGIKNN	CDASYALLI	CMR	DNISKFLFP
BcucGOBP19a	DEYRNLGKCKDAA	VGIKNN	CDASYALLI	CMR	DNITKVFVP
AludOBP19d	REKLGKELIDACKDTP	PAKAGNE	CESVEALRE	CFIAKAKE	NGFRLPW
BoleGOBP19d-like	YEKQSMELVNECKNT	PASSNE	CYAEAFRV	CVIESKSKS	KGIKILPQ
BcucGOBP19d-like	LEKLGSTEYVNECKNT	PANSNE	CYAEAVRA	CTIENSKS	KGIKILPQ
AludOBP19d-like-1	EKLLNVLQKCAEET	EKETDN	CERASVAAM	CVL	DELKGGVGTN
AfraOBP19d	EKLLNVLQKCAEET	EKETDN	CERASVAAM	CVL	DELKGGVGTN
AoblOBP19d	EKLLNVLQKCAEKT	EKETDN	CERASVAAM	CVL	DELKGGVGTN
RzepGOBP19d-like	EKLLNVLQKCSDET	EKQIDN	CERAFAAAT	CVL	DELKGGVGTN
AludOBP19d-like-2	IEKLGKEL				
CcapGOBP19d-like	EKLLSVIRKCS	EET.EKQTDN	CERAFLAAK	CIL	LELKEGVTN
BoleGOBP19d-like	DSLGLDVLQKCSRET	NKQADN	CERAFMASS	CIL	RELQEGVTN
BtauGOBP19d	LEKLGSTEYVNECKNT	PASSNE	CYAEAVRV	CTIENSKS	KGIKILPQ
AludOBP28a-like					
RzepGOBP28a-like	KMKTANEITD	ACAGIAVPDDH	CEAAEYIGK	CFMEQAKA	HGLDKFEF
BoleGOBP28a-like	KLKIAREIID	ACADIAVPDDH	CEASELYGK	CFMEQAKA	RGIQKDFD
BcucGOBP28a-like	KLKIAREIID	ACADIAVPDDH	CEATEVYGK	CFMEQAKA	HGIEKFEF
AludOBP49a	LANHRLHSLC	APFS.AMVMG	CKMETFON	CPTS	
AfraOBP49a	VANHRLHSPC	APFS.AMVMG	CKMETFON	CPTSTWNT	EECNTMRFSMKQC
AoblOBP49a-1	VANHRLHSPC	APFS.AMVMG	CKMETFON	CPTSAWNT	EECNTMRFSMKQC
RzepGOBP68-like	...QKFOPLC	SPFS.AMTMG	CKMFAFON	CPSSTWNT	EECNTMRFSMKQC
BdorOBP50e	...MGNCS	SPVS.GMLMM	CVNIEFTFN	CPASAWNS	TECNATRNFKQC
AludOBP50c	...EGCSRCP	.LAFSG	CMWREFWNG	CPAELHVD	PKCNKLRERVTKN
AoblOBP50a	...EGCSRCP	.LAFSG	CMWREFWNG	CPAELHVD	PKCNKLRERVAKN
AfraOBP50a-1	...EGCSRCP	.LAFSG	CMWREFWNG	CPAELHVD	PKCNKLRERVAKN
AfraOBP50a-2	...EGCSRCP	.LAFSG	CMWREFWNG	CPAELHVD	PKCNKLRERVAKN
BdorOBP50c	...EGCSRSP	.LAFHS	CMWRQFNG	CPTDLRVDS	PKCNKLRERVANG
AludOBP56a-1	ERLLNIVNS	CLNVG..GAND	CKVYKFHA	CASPEF	DKVRGDIIFQP
AfraOBP56a-like	ERLLNIVNS	CLNVG..GAND	CKVYKFHA	CASPEF	DKVRGDIIFQP
RzepGOBP56a-like	ERLLQIVNS	CLTAG..GAND	CKVYKFHA	CASPEF	DKVRGDIIFQP
CcapGOBP56a_isoform_X1	ERLLMIVNS	CLNAG..GAND	CKVYKFHA	CASPEF	DKVRGDIIFQP
BcucOBR	QRLLNIVNS	CLNAG..GAND	CKVYKFHA	CASPEF	DKVRGDIIFQP
AludOBP56a-2	ERLLNIVNS	CLNVG..GAND	CKVYKFHA	CASPEF	DKVRGDIIFQP
BdorOBP56a	QRLLNIVNS	CLNAG..GAND	CKVYKFHA	CASPEF	DKVRGDIIFQP
AludOBP57c-like	D...MIECKAAN	DMEDDP	CEYSFGVML	CARMIHAND	EYDEYAEDVPMAREVI
AfraOBP57c	D...MIECKAAN	DMEDDP	CEYSFGVML	CARMIHAND	EYDEYAEDVPMAREVI
AoblOBP57c	D...MIECKAAN	DMEDDP	CEYSFGVML	CARMIHAND	EYDEYAEDVPMAREVI
BdorOBP57c	N...MLECKAAN	DMEDDP	CEYSFGVML	CARMIHAND	EYDEYAEDVPMAREVI
CcapGOBP57c	S...MLECKAAN	DMEDDP	CEYSFGVML	CARMIHAND	EYDEYAEDVPMAREVI
AludOBP83a-like	.IALHMGKKCLYPK	..GDTK	CERAFWLHR	CWK	ESDPKHYFLI
CvesOBP3	.IALHMGKKCLYPK	..GDTK	CERAFWLHR	CWK	ESDPKHYFLI
RzepPBR_6-like	.IALHMGKKCLYPK	..GDTK	CERAFWLHR	CWK	ESDPKHYFLI
CcapOBP83a	.IALHMGKKCLYPK	..GDTK	CERAFWLHR	CWK	ESDPKHYFLI
AludOBP83ef	RLASDVCKVSAEQM	.QTRDK	CEWMEYEEYN	CLERLNYN	TDGSYPLETT
AoblOBP83ef	RLASDVCKVSAEQM	.QTRDK	CEWMEYEEYN	CLERLNYN	TDGSYPLETT
AfraOBP83ef	RLASDVCKVSAEQM	.QTRDK	CEWMEYEEYN	CLERLNYN	TDGSYPLETT
BdorOBP83ef	RTASNVCVSAEQM	.KTRDK	CEWMEYEEYN	CLERLNYN	TDGSYPLETT
GmorOBP3	NADISICRVNANER	.EKMDI	CAIMYEEYN	CWERLNYN	TDGISVTYK
AludOBP83g	AKISHGLEKCIDHN	.EHDSDT	CTWANRVFS	CWISVNR	IVRRTYIAN
AfraOBP83g	AKISHGLEKCIDHN	.EHDSDT	CTWANRVFS	CWISVNR	IVRRTYIAN
AoblOBP83g	AKVSHGLEKCIDHN	.EHDSDT	CTWANRVFS	CWISVNR	IVRRTYIAN
BcucOBR	AKVSHGLEKCIDHN	.EHDSDT	CTWANRVFS	CWISVNR	IVRRTYIAN
CcapGOBP99a	AKVSHGLEKCIDHN	.EHDSDT	CTWANRVFS	CWISVNR	IVRRTYIAN
AludOBP84a-like	S...IPVCQNEG	.SRETCP	CKRTYAIK	CLMIR	ALVDARNKPI
BcucGOBP84a-like	S...IPVCQNEG	.SRETCP	CKRTYAIK	CLMLR	ALVDARNKPI
BoleGOBP84a-like	S...IPVCQNEG	.SRETCP	CKRTYAIK	CLMLR	ALVDARNKPI
CcapGOBP84a-like	S...IPVCQNEG	.SRESCP	CKRTYAIK	CLMIR	ALVDARNKPI
AludOBP99a-like	AEVLAIAQGCADKN	.EQGSSA	DVVAAYRGHK	CLMASKVG	EKVKAFIKKR
AfraOBP99c	AEVLAIAQGCADKN	.EQGSSA	DVVAAYRGHK	CLMASKVG	EKVKAFIKKR
AoblOBP99c	AEVLAIAQGCADKN	.EQGSSA	DVVAAYRGHK	CLMASKVG	EKVKAFIKKR
RzepGOBP99a	AEVLAIAQGCADKN	.EQGSSA	DVVAAYRGHK	CLMASKVG	EKVKAFIKKR
BcucGOBP99a-like	AEVLAIAEGCVDKN	.VEGSSA	DVVAAYRGHK	CLMASKIG	DRVKAFIKKT
AludOBP99b	GDVHAKIENCAKEG	.ADAADA	CTRAYRGIT	CFFKNNLS	LVKQSVGSA
AfraOBP99b	GDVHAKIENCAKEG	.ADAADA	CTRAYRGIT	CFLKNNLS	LVKQSVGSA
AoblOBP99b	GDVHAKIENCAKEG	.ADAADA	CTRAYRGIT	CFLKNNLS	LVKQSVGSA
CcapGOBP99a	NELHGKIENCAKEG	.DAAGEDA	CTRAYRGAL	CFFKENLA	LVKQSVASK
RzepGOBP99b	DDLHKTIESCAKEG	.ADSDDS	CTRAYRGGI	CLINNNLT	LVKQSVVSD
AludOBP99c	AEDMDIKN	CVAKP.EG	..AEVHGLPGHL	CILNSRLR	DNLKKYHVGE
AfraOBP99a-like	AEDMDIKN	CVKSE.E	..EDLHVRRLYL	CILNTRLR	DNLKKYHVGE
CcapGOBP99a	AEVVAIAEGCVDKN	.EQGSSA	DVVAAYRGHK	CLMASKIG	DRVKAFIKKR
DbipGOBP99a	EEALQIAQGCADKN	.PQSPSD	DVVAAYRGHK	CMMASKIG	DKVRAFVRSK
DmelOBP99c	EEALQIAQGCADKN	.AQKPTL	DVVAAYRGHK	CMMASKIG	DKVRAFVRSK
AludOBP_0S-F (OBP83a)	.KLINMAKDCVHPE	..GDTL	CHKAWWFHQ	CWK	KADPVHYFLP
BdorPBR6	.QLINMAKDCVHPE	..GDTL	CHKAWWFHQ	CWK	KADPVHYFLP
BcucPBR6	.QLINMAKDCVHPE	..GDTL	CHKAWWFHQ	CWK	KADPVHYFLP
CcapPBR6-like	.KLINMAKDCVHPE	..GDTL	CHKAWWFHQ	CWK	KADPVHYFLP
DmelOBP83a-C	.KLMFMSKGCVHPE	..GDTL	CHKAWWFHQ	CWK	KADPVHYFLP

A7 (Continuación). Alineamiento de OBPs de *A. ludens* con homólogos en otras especies.

```

150
AludOBP8a      LHDTKKANHVD.....
AfraOBP8a      LHDTKKANHVD.....
AoblOBP8a      LHDTKKANHVD.....
RzepGOBP99a-like-X2  LQDTKTTNHLG.....
CvesOBP2       LQETKTTNHVG.....
AludOBP19a    .....
AoblOBP19a    .....
RzepGOBP19a-like .....
BdorOBP19a    .....
BcucGOBP19a    .....
AludOBP19d    .....
BoleGOBP19d-like .....
BcucGOBP19d-like .....
AludOBP19d-like-1 I.....
AfraOBP19d    I.....
AoblOBP19d    I.....
RzepGOBP19d-like I.....
AludOBP19d-like-2 .....
CcapGOBP19d-like I.....
BoleGOBP19d-like I.....
BtauGOBP19d   .....
AludOBP28a-like .....
RzepGOBP28a-like .....
BoleGOBP28a-like .....
BcucGOBP28a-like .....
AludOBP49a    .....
AfraOBP49a    KRDRATE.....
AoblOBP49a-1  KRDRSTE.....
RzepGOBP68-like KKKK.....
BdorOBP50e    KFPKDG.....
AludOBP50c    DIQFFGKHLFLFKYYPNSME..
AoblOBP50a    DTKFFGKYLLYIYYPNSDE..
AfraOBP50a-1  DIQFFGKHLFLFKYYPNSNE..
AfraOBP50a-2  DIQFFGKNLLFKYYPHSIE..
BdorOBP50c    DTRFFGKHFLHKYYPNPHDEE
AludOBP56a-1  DE.....
AfraOBP56a-like .....
RzepGOBP56a-like DE.....
CcapGOBP56a_isoform_X1 DE.....
BcucOBR       DE.....
AludOBP56a-2  DD.....
BdorOBP56a    DE.....
AludOBP57c-like M.....
AfraOBP57c    M.....
AoblOBP57c    M.....
BdorOBP57c    RRK.....
CcapGOBP57c   RRK.....
AludOBP83a-like .....
CvesOBP3      .....
RzepPBP83a   .....
CcapOBP83a   .....
AludOBP83ef  TLSSAVIASKTASEAKE.....
AoblOBP83ef  TLSSAVIASKTASEAKE.....
AfraOBP83ef  TLSSAVIASKTASEAKE.....
BdorOBP83ef  TLSSVIARKTAASVEDKTKAS
GmorOBP3     ALKKIFNF.....
AludOBP83g   .....
AfraOBP83g   .....
AoblOBP83g   .....
BcucOBR       .....
CcapGOBP99a  .....
AludOBP84a-like V.....
BcucGOBP84a-like V.....
BoleGOBP84a-like V.....
CcapGOBP84a-like V.....
AludOBP99a-like MEEAQKQ.....
AfraOBP99c   MEEAQKQ.....
AoblOBP99c   MEEAQKQ.....
RzepGOBP99a  AEDAQKQ.....
BcucGOBP99a-like VEEAKKQ.....
AludOBP99b   .....
AfraOBP99b   .....
AoblOBP99b   .....
CcapGOBP99a  .....
RzepGOBP99b  .....
AludOBP99c   .....
AfraOBP99a-like .....
CcapGOBP99a  VEEAKKQ.....
DbipGOBP99a  .QEAKA.....
DmelOBP99c   AEEAKKKA.....
AludOBP_OS-F (OBP83a) .....
BdorPBP83a   .....
BcucPBP83a   .....
CcapPBP83a-like .....
DmelOBP83a-C .....

```