



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



101
años

Trabajo de Integración Curricular

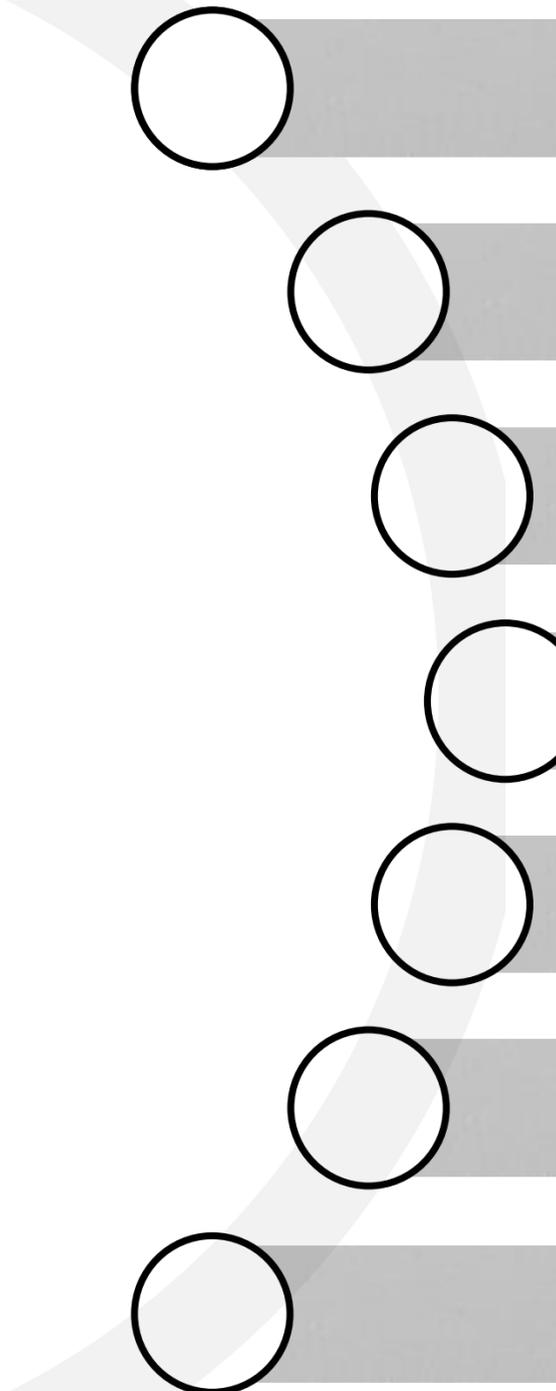
Optimización de las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia Tabanidae del marcador molecular COI.

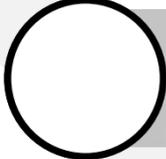
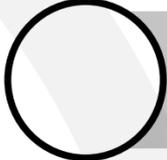
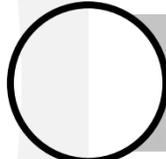
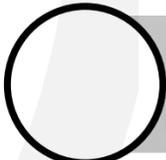
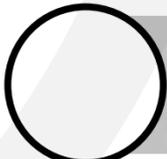
Autor: Uwe Jens Nickelsen Cordovez

Director: Sarah Martin Solano Ph.D.

31 de Agosto de 2023





	Introducción
	Justificación
	Objetivos e Hipótesis
	Materiales y Métodos
	Resultados y Discusión
	Conclusiones
	Recomendaciones

Familia Tabanidae

Introducción

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Suborden: Brachycera

Infraorden: Tabanomorpha

Familia: Tabanidae

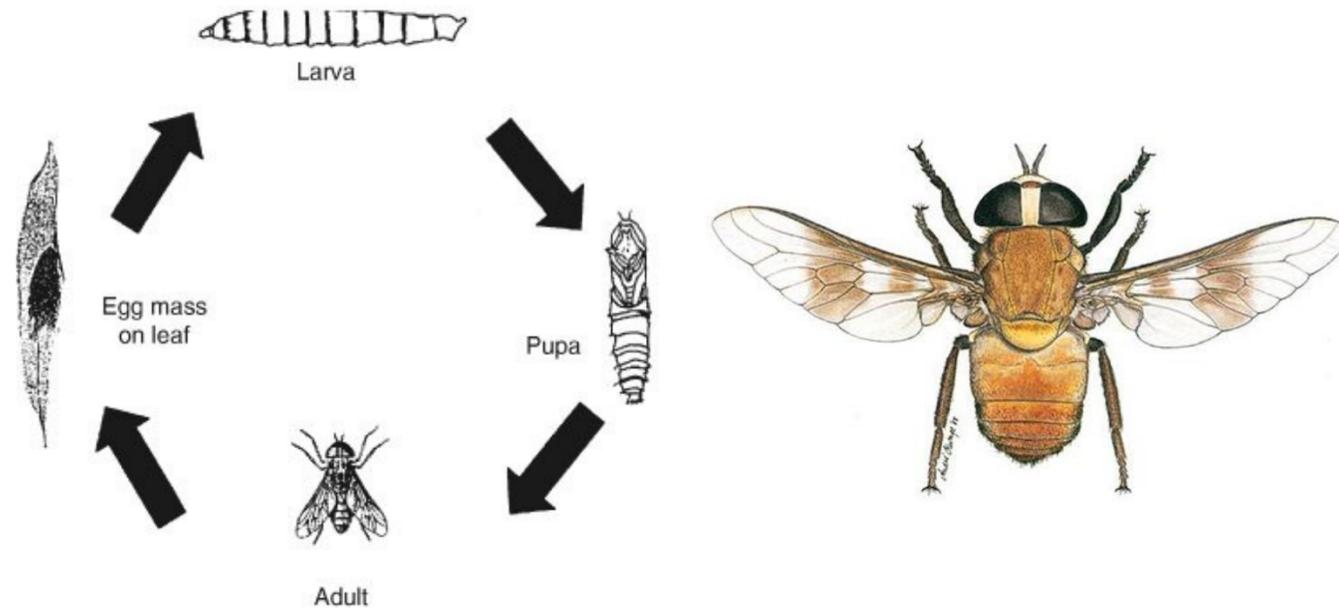
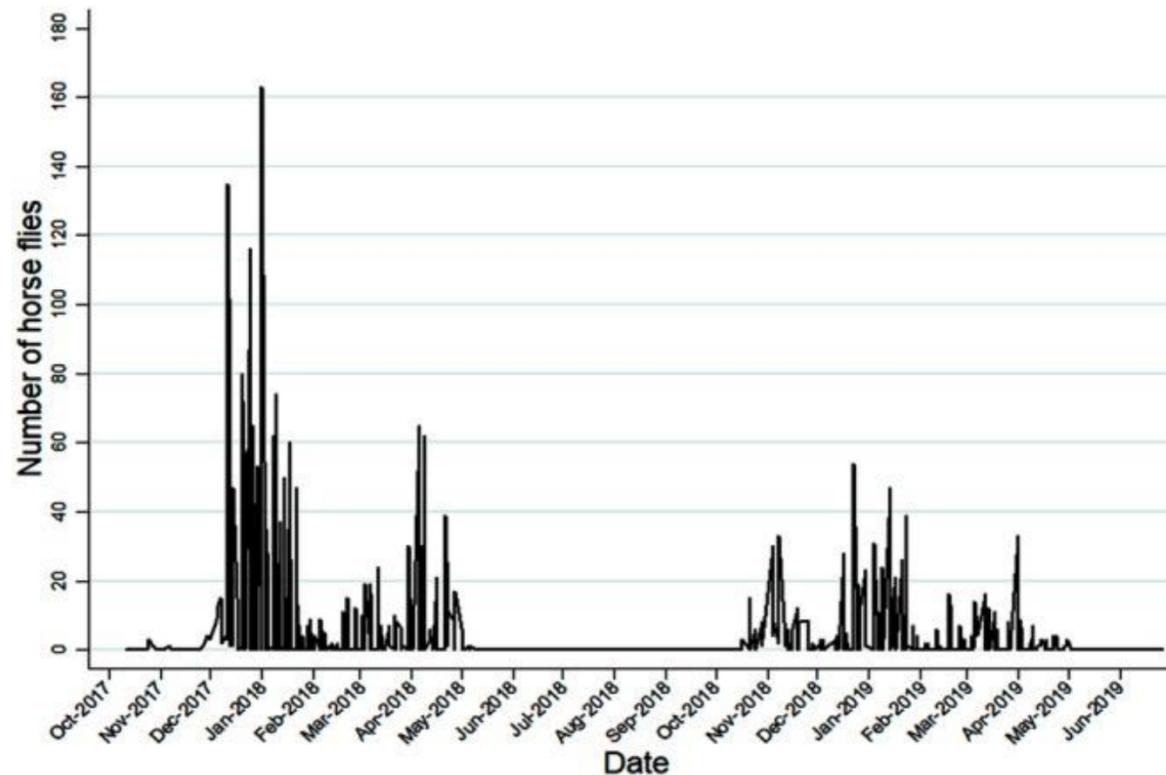
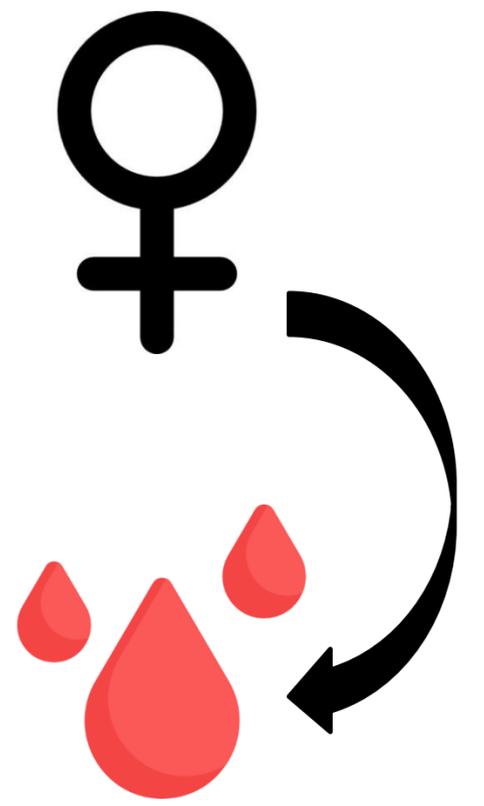


Figura 1: Ciclo de vida de moscas pertenecientes a la familia Tabanidae



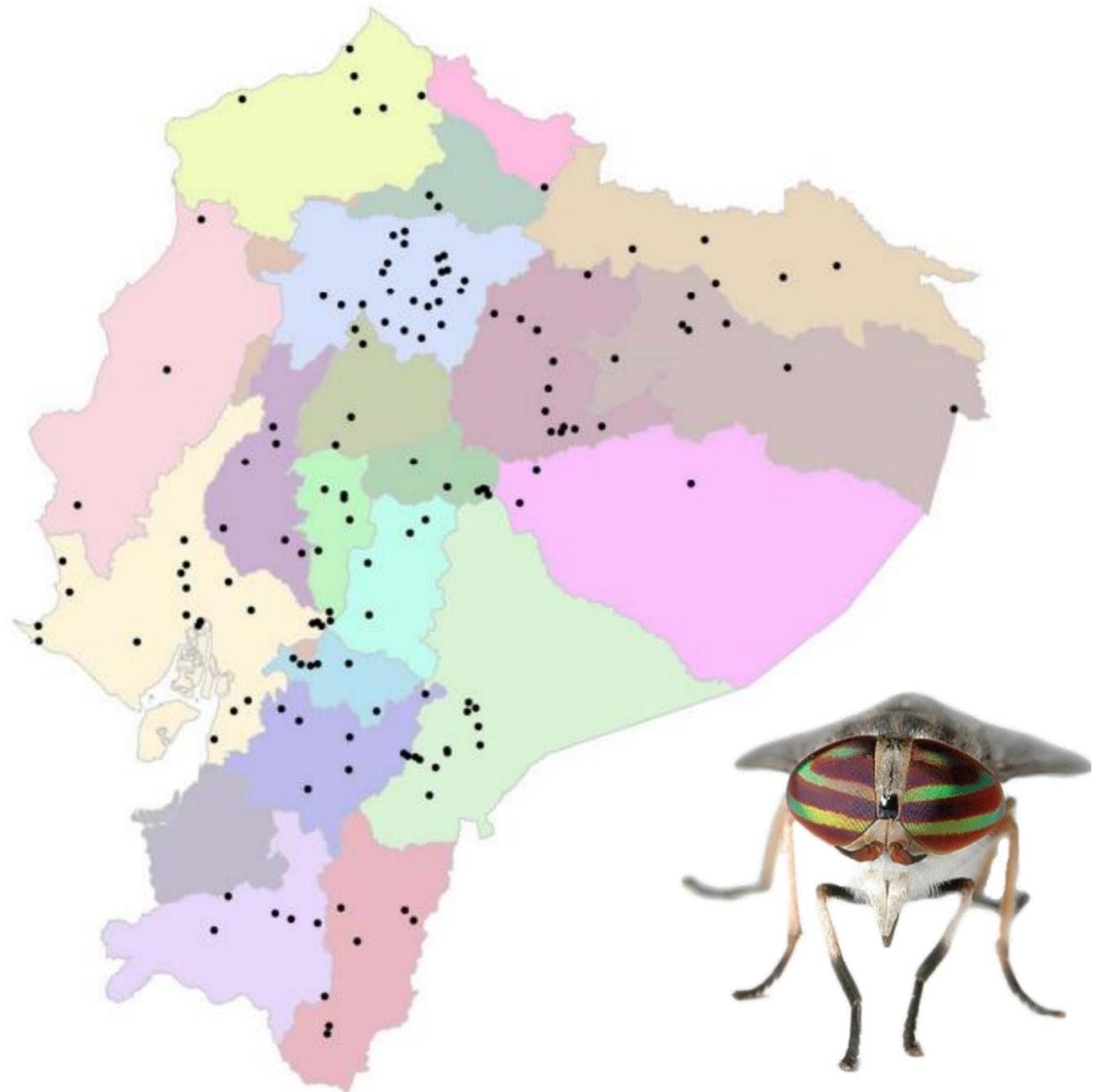
Distribución

- Distribución global a excepción de la Antártida
- Alrededor de 4 300 especies
- Descritos 133 géneros



- Ántrax
- Leptospirosis
- Anaplasmosis
- Tripanosomiasis
- Fiebre de pantano
- Loiasis

(Banerjee et al., 2015; Mullens, 2019)



204 especies descritas

Aparición recurrente de nuevas especies

Zonas biogeográficas compartidas con:

Colombia - Perú – Venezuela - Brasil

Pangoninae: Tribu Pangonini (1 género, 15 especies) y Shonini (4 géneros, 31 especies).

Chrysopsinae: Tribu Chrysopsini (1 género, 7 especies).

Tabaninae: Tribu Diaclorini (25 géneros, 111 especies) y Tabanini (3 géneros, 40 especies).

Figura 2: Localidades de estudio del único repertorio nacional de tábanos en Ecuador (Buestán et al., 2012)

PCR

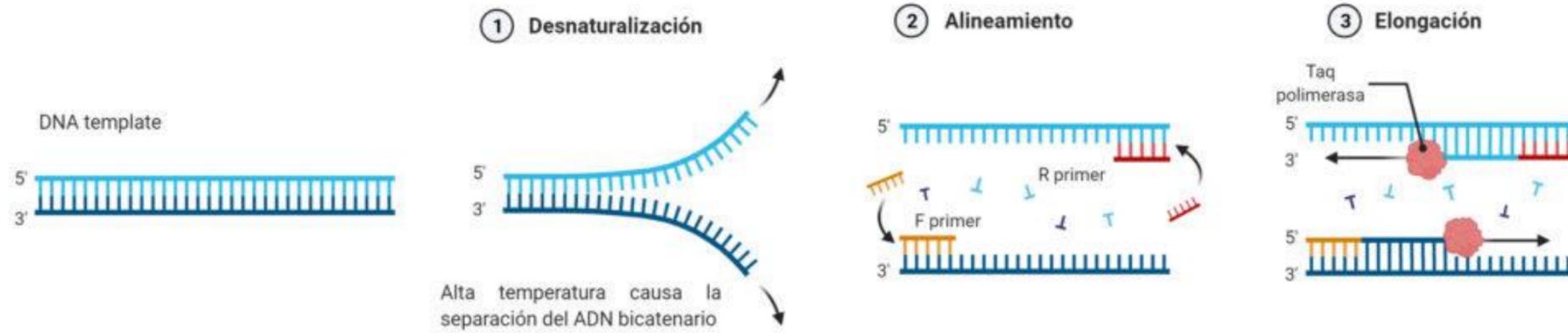
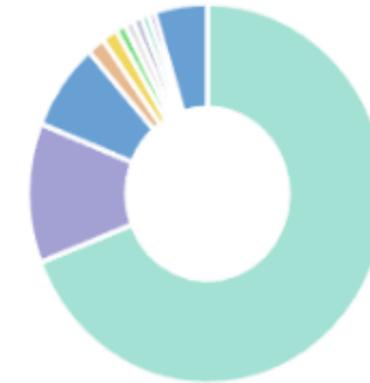


Figura 3. Pasos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Aporte mundial



- Centro de Genómica de Biodiversidad: 7915
- Extraído de GenBank, NCBI: 1359
- Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica: 856
- Royal Ontario Museum: 182
- Universidad McGill, Museo Entomológico Lyman: 161
- Museo Argentino de Ciencias Naturales, Bernardino Rivadavia: 103
- Universidad de Manitoba, Museo de Entomología Wallis Roughley: 94
- Instituto Noruego de Investigación de la Naturaleza: 89
- Universidad de Guelph: 78
- Museo Finlandés de Historia Natural, Museo Zoológico: 66
- Otros: 546

Gen COI

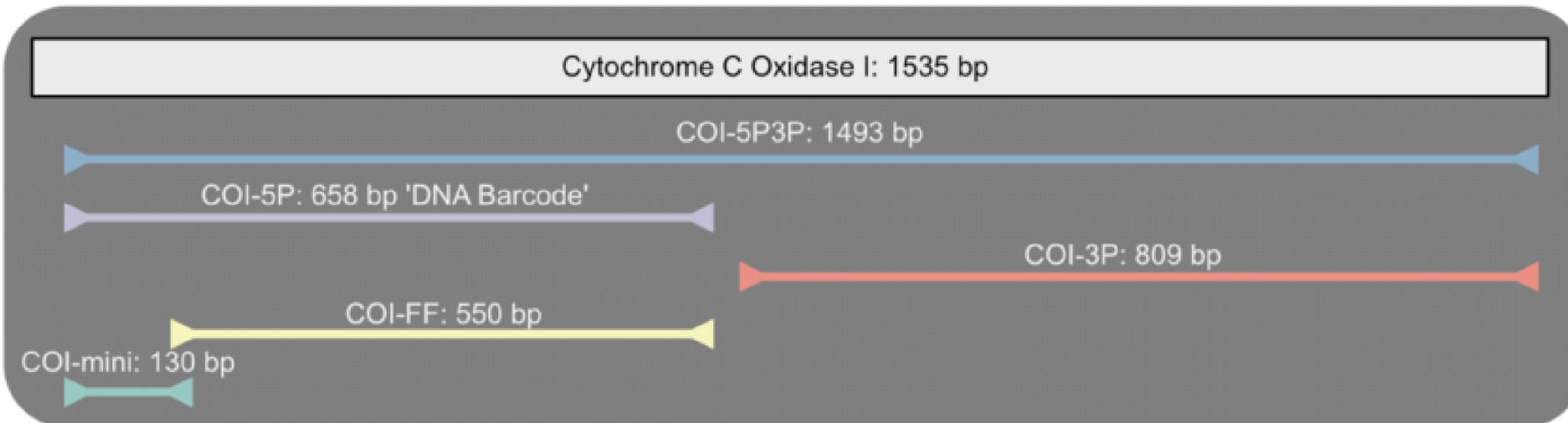


Figura 4. Fragmentos típicos del gen COI.

Figura 5. Aportes de secuencias del gen COI de tábanos

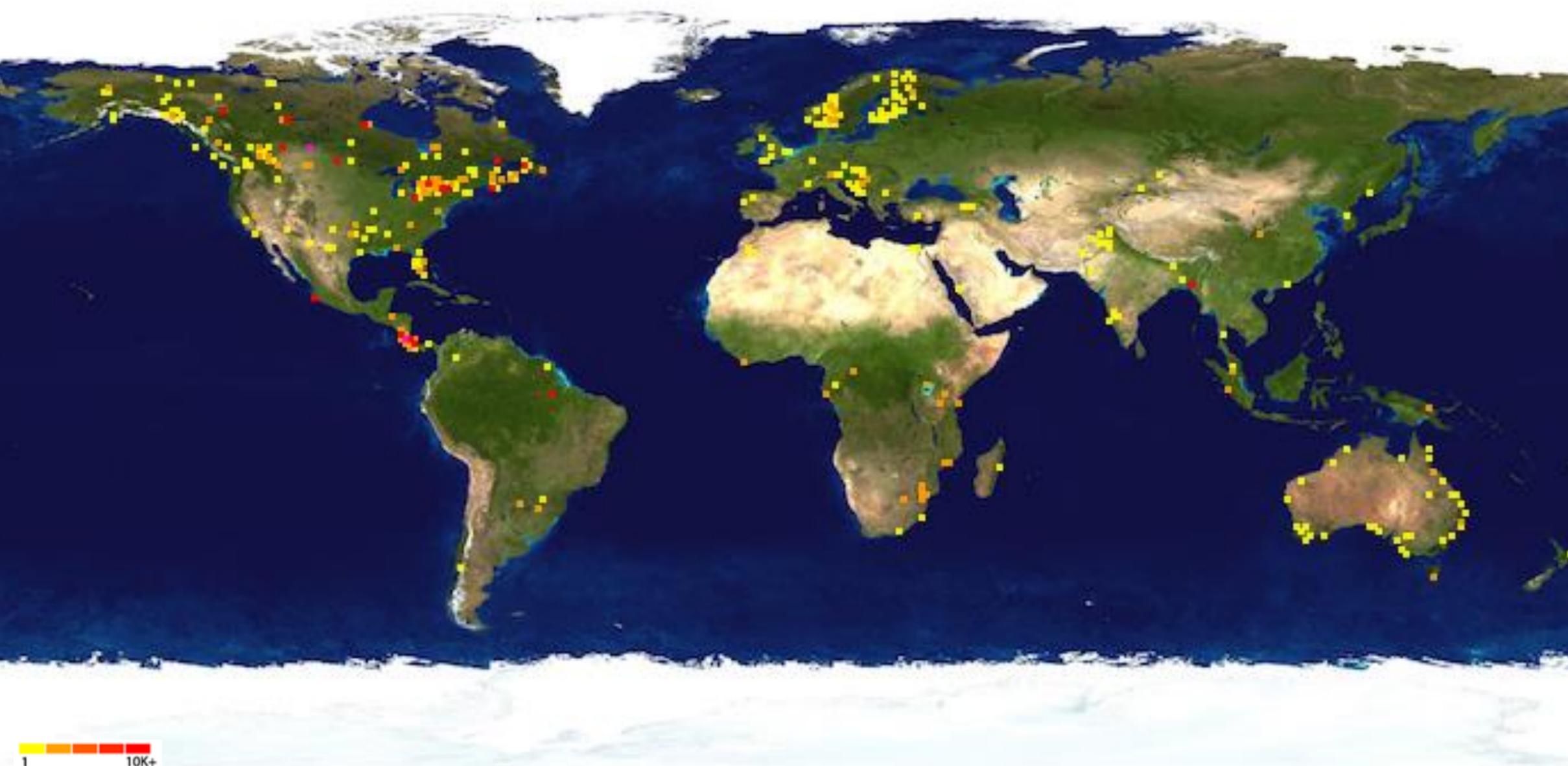
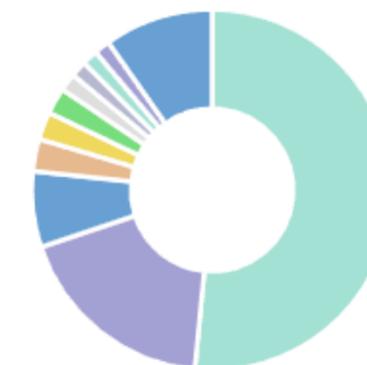


Figura 6. Aportes de secuencias del gen COI de tábanos, recuperado de BOLD Systems

Encontrado **11,449** registros publicados, con **11,449** registros con secuencias, formando **946** BIN (clústeres), con muestras de **53** países, depositado en **56** instituciones.



- Canada: 5900
- Costa Rica: 2100
- Unspecified*: 779
- Brazil: 331
- United States: 283
- South Africa: 271
- Thailand: 182
- Mexico: 163
- Australia: 162
- Norway: 161
- Others: 1117

Figura 7. Aportes de secuencias del gen COI de tábanos

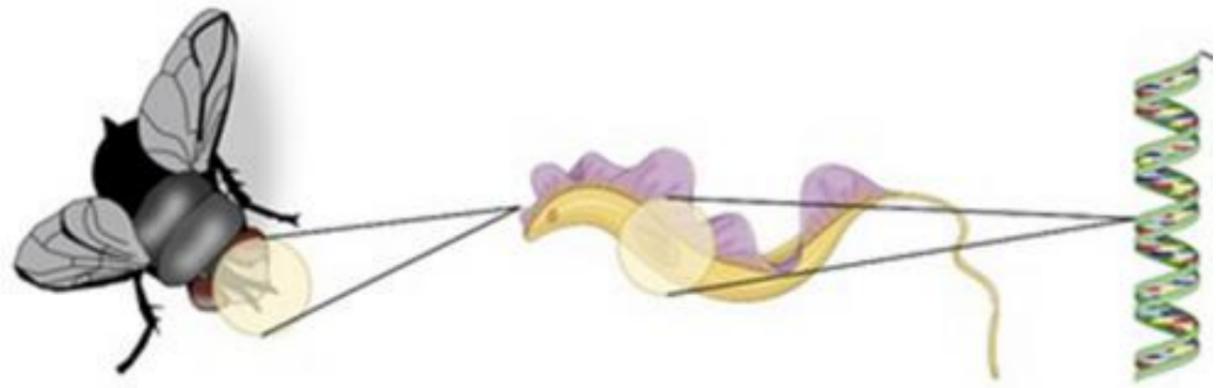
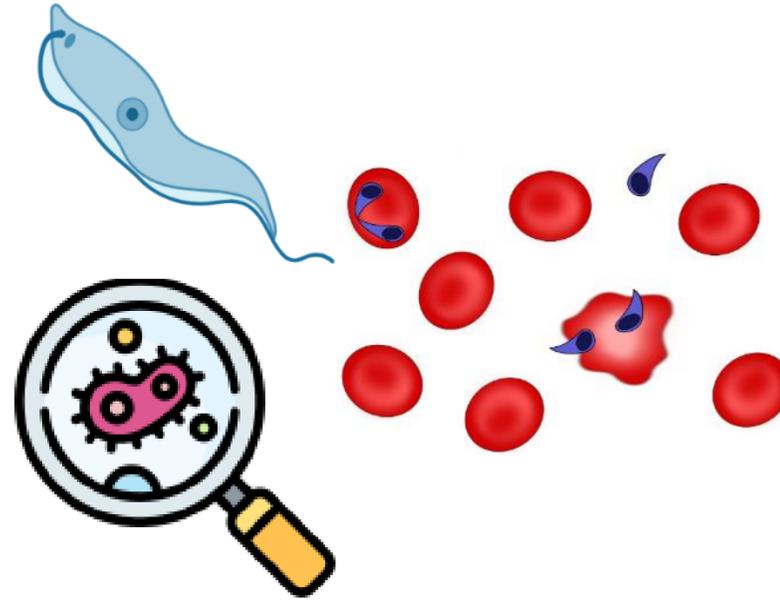


Figura 8: Detección de DNA de hemoparásitos en tábanos

Afecciones



25% Pérdida lechera

0.1 kg/día



Requerimiento de especialización para su taxonomía tradicional

Afección a especies de interés productivo

Ausencia de técnicas moleculares ya establecidas en el país

Identificación taxonómica precisa

Estrategias para control especie-específicas

Aplicación de estrategias en un contexto internacional

Objetivo General

- Optimizar las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia Tabanidae del marcador molecular COI.

Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN mediante variaciones en los pasos críticos del proceso para la posibilidad de la identificación de los insectos muestreados.
- Establecer el protocolo de PCR Barcoding con la aplicación del marcador molecular COI para aplicarlo en ADN de insectos de la familia Tabanidae.
- Inferir la filogenia de la familia Tabanidae mediante las secuencias del gen COI disponibles en bases de datos para relacionarlo a la taxonomía morfológica descrita sobre especies presentes en el país.



Hipótesis

El marcador molecular COI permite la identificación a nivel de especie para los insectos de la familia Tabanidae.

H₀: El marcador molecular COI no permite la identificación a nivel de especie para los insectos de la familia Tabanidae.

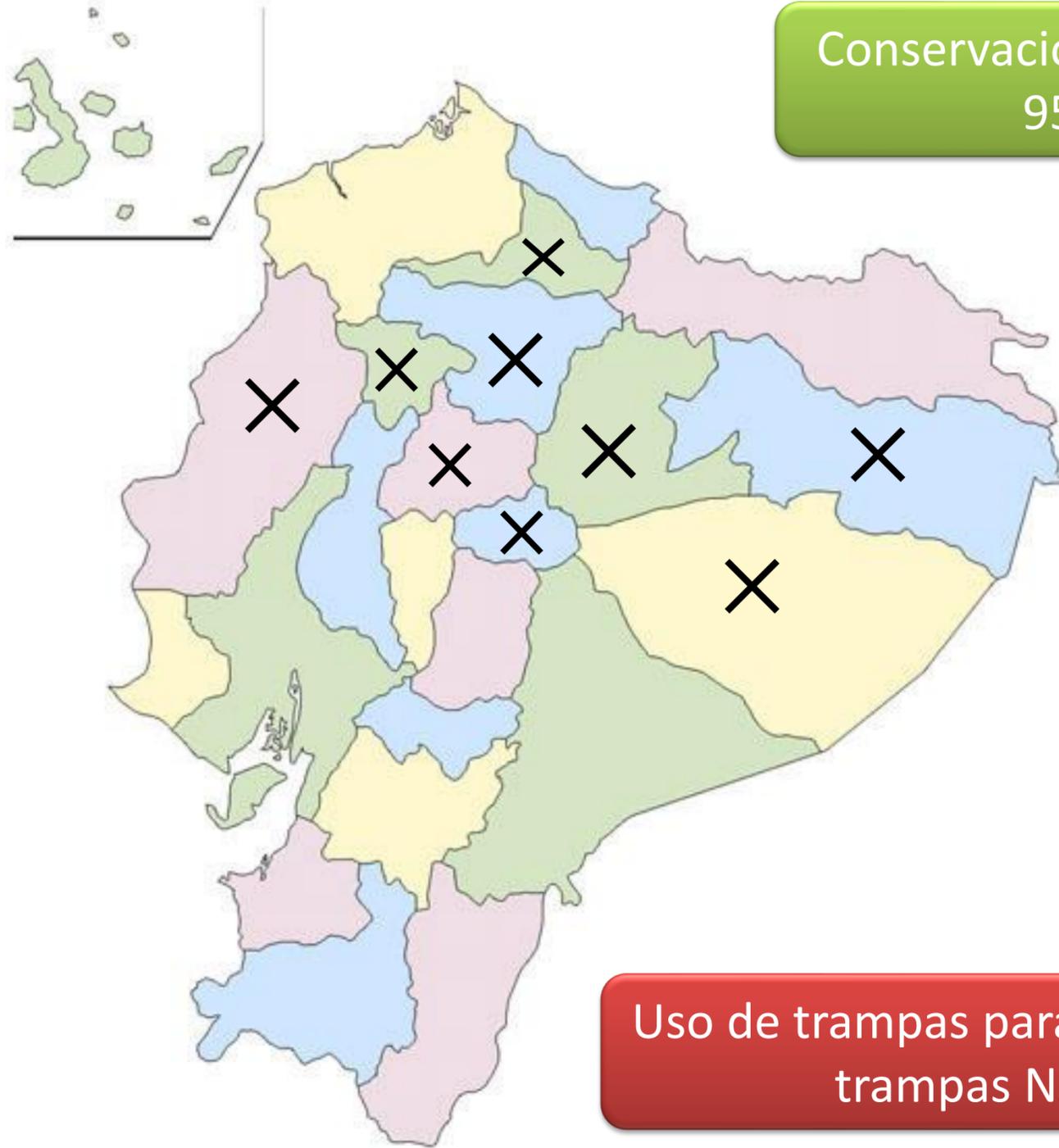
Muestreo

Provincias de muestreo:

- Pastaza
- Pichincha
- Manabí
- Orellana
- Napo
- Sto. Domingo de los Tsáchilas
- Imbabura
- Cotopaxi
- Tungurahua



Figura 8. Trampa para tábanos



Conservación en etanol
95%

Uso de trampas para tábanos y
trampas NZI

Materiales y Métodos



Figura 9. Trampa NZI

Muestreo total: 60 moscas

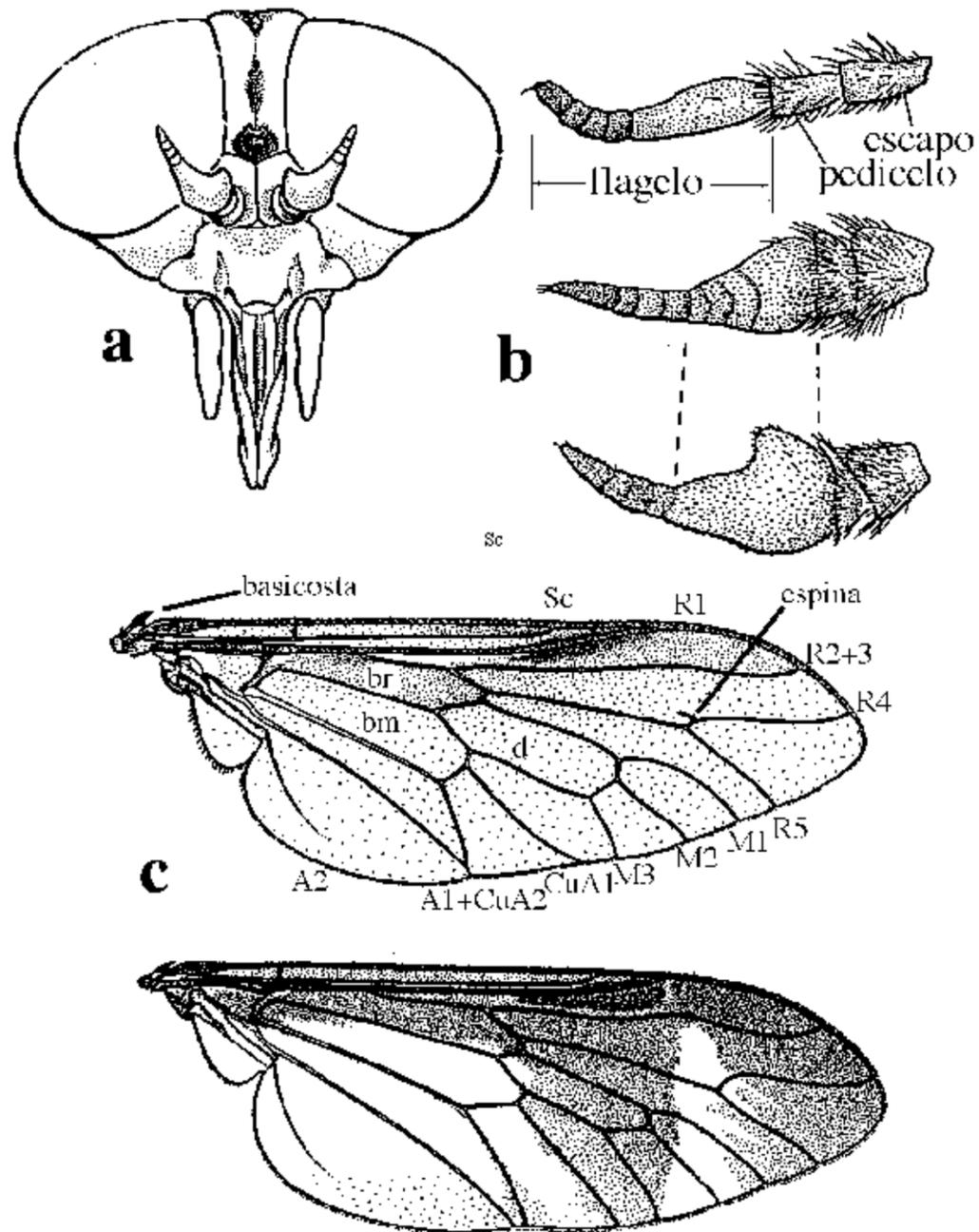


Figura 10. Características morfológicas para distinción de especies pertenecientes a la familia Tabanidae. Tomado de: (Burger, 2008)

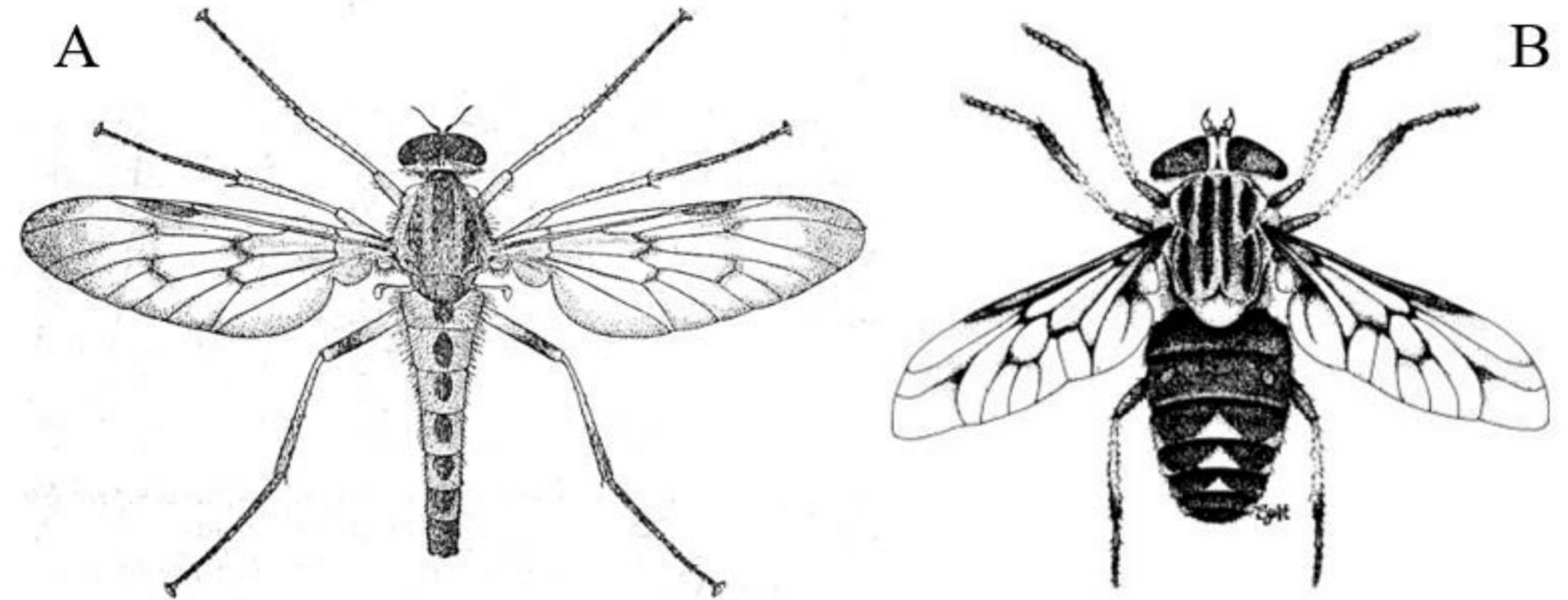


Figura 11. Tabanomorfos. A) Rhagionidae. B) Tabanidae. Tomado de: (Mullens, 2019)

- ❖ Ojos compuestos prominentes.
- ❖ Antenas cortas compuestas compuestas de tres segmentos
- ❖ Ala característica de Tabanomorpho, con celda distal y cinco celdas marginales
- ❖ Cuerpo aplanado

Extracción de ADN total

Materiales y Métodos

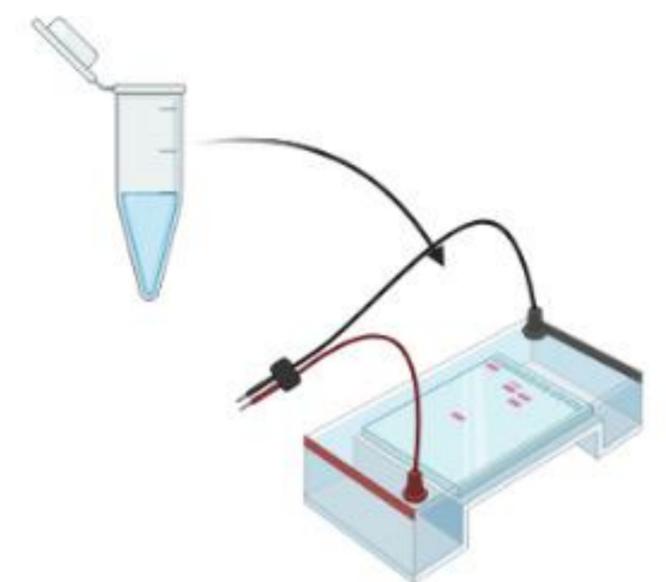
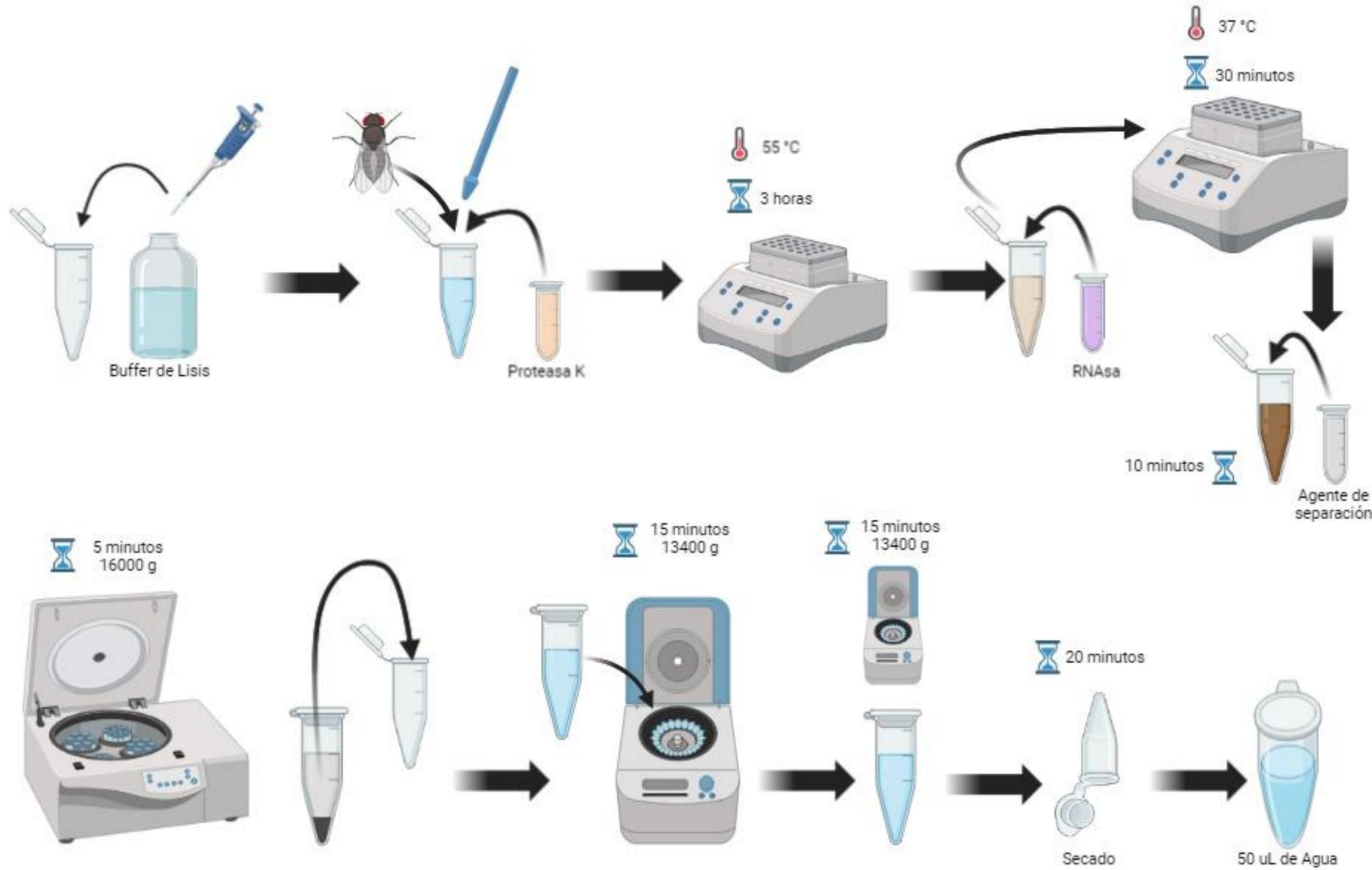
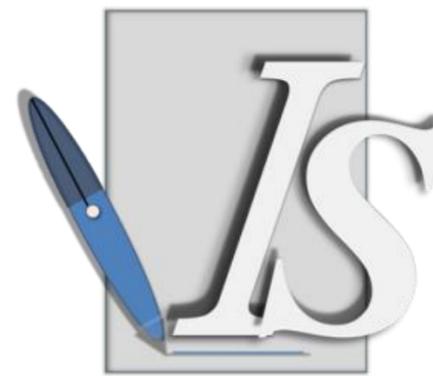


Figura 12. Protocolo manual de extracción de ADN

Variable	Opción	Composición
Buffer de Lisis	Buffer 1	50 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS
	Buffer 2	50 mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS
	Buffer 3	50 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS
Reactivo de separación de fases	Cloroformo/ Alc. Isoamílico	Proporción Cloroformo/Alc. Isoamílico 24:1
	NaCl	NaCl 5M llevado a 1.1M en el volumen final



Análisis supuesto de normalidad:
Shapiro-Wilks Alpha: 0.05
Q-Q Plot

Análisis supuesto de homogeneidad e independencia:
Diagrama de dispersión PRED vs RDUO

ANOVA para análisis de significancia de los tratamientos

Test de Tukey con Alpha: 0.05 para selección del mejor tratamiento

Diagramas de Caja y Bigotes para representación gráfica

Tabla 1: Parámetros variados en el protocolo de extracción de ADN.

Protocolo de PCR

Materiales y Métodos

Cebador	Secuencia
TY-J-1460	TAC AAT TTA TCG CCT AAA CTT CAG CC
C1-N-2329	ACT GTA AAT ATA TGA TGA GCT CA

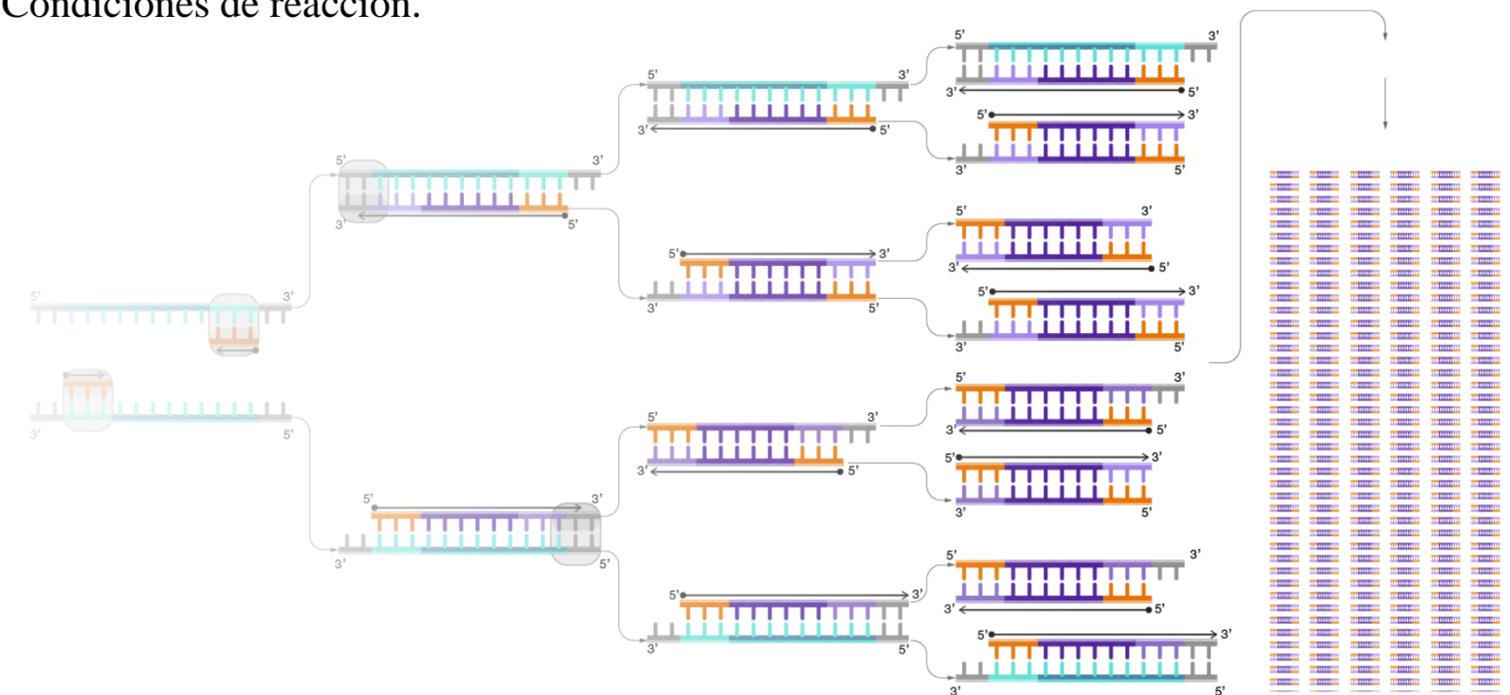
Tabla 2: Cebadores recuperados de: (Lessard et al., 2013).

TAQ PRECISIÓN (ABM)				
Reactivos	Unidad	Stock	Concentración Final	Volumen (μL)
H2O	μL	N/A	-	-
Buffer	X	5.00	1.00	5.00
TY-J-1460	μM	10.00	0.25	0.63
C1-N-2329	μM	10.00	0.25	0.63
MgSO4	mM	25.00	-	-
dNTP	mM	40.00	0.80	0.50
Taq	U/μL	5.00	0.50	0.10
ADN	ngr/ul	-	-	2.00
			Total	25.00

Tabla 3: Mastermix establecida para PCR.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35
Hibridación	X °C	60 segundos	35
Extensión	72°C	90 segundos	35
Extensión final	72°C	5 minutos	1
Mantenimiento.	4°C	-	-

Tabla 4: Condiciones de reacción.



BOLD SYSTEMS



GenBank

Fragmentos del gen COI de 659 pb

A C T T G C A T T
A A C T T G C A T



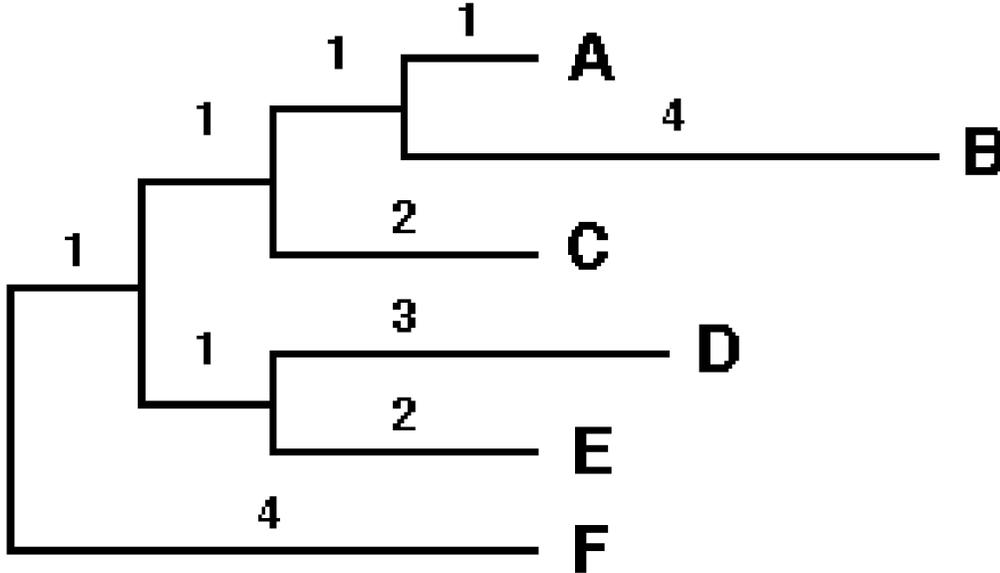
Molecular Evolutionary Genetics Analysis

Selección de 60 secuencias

59 especies de tábanos
1 *Musca domestica*

Análisis Neighbor Joining
1000 bootstraps

Modelo Tamura-Nei con
escala de divergencia 0.02%



(Jumbo, 2021; Shashank et al., 2022; Lessard et al., 2013)

60 moscas muestreadas

10 tábanos

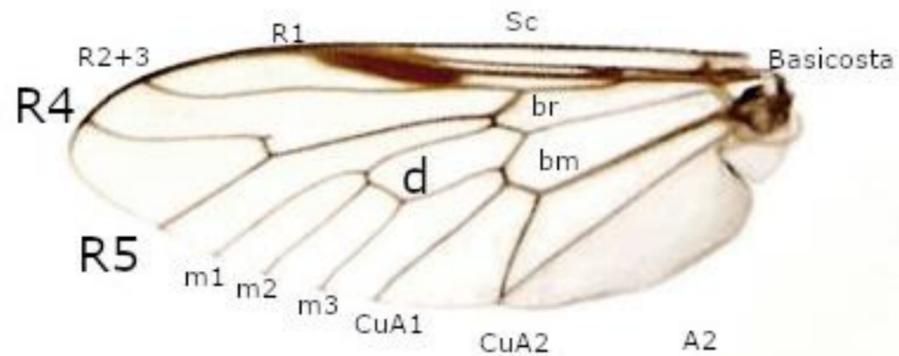


Figura 13. Estructura ala de Tabanidae

Muestra	Provincia de recolección
J1	Manabí
J2	Manabí
J3	Manabí
J4	Manabí
O1	Orellana
M1	Pichincha
Sf	Santo Domingo
S1	Pichincha
S2	Pichincha
P1	Napo
Rhag	Cotopaxi

Tabla 5: Muestras recolectadas

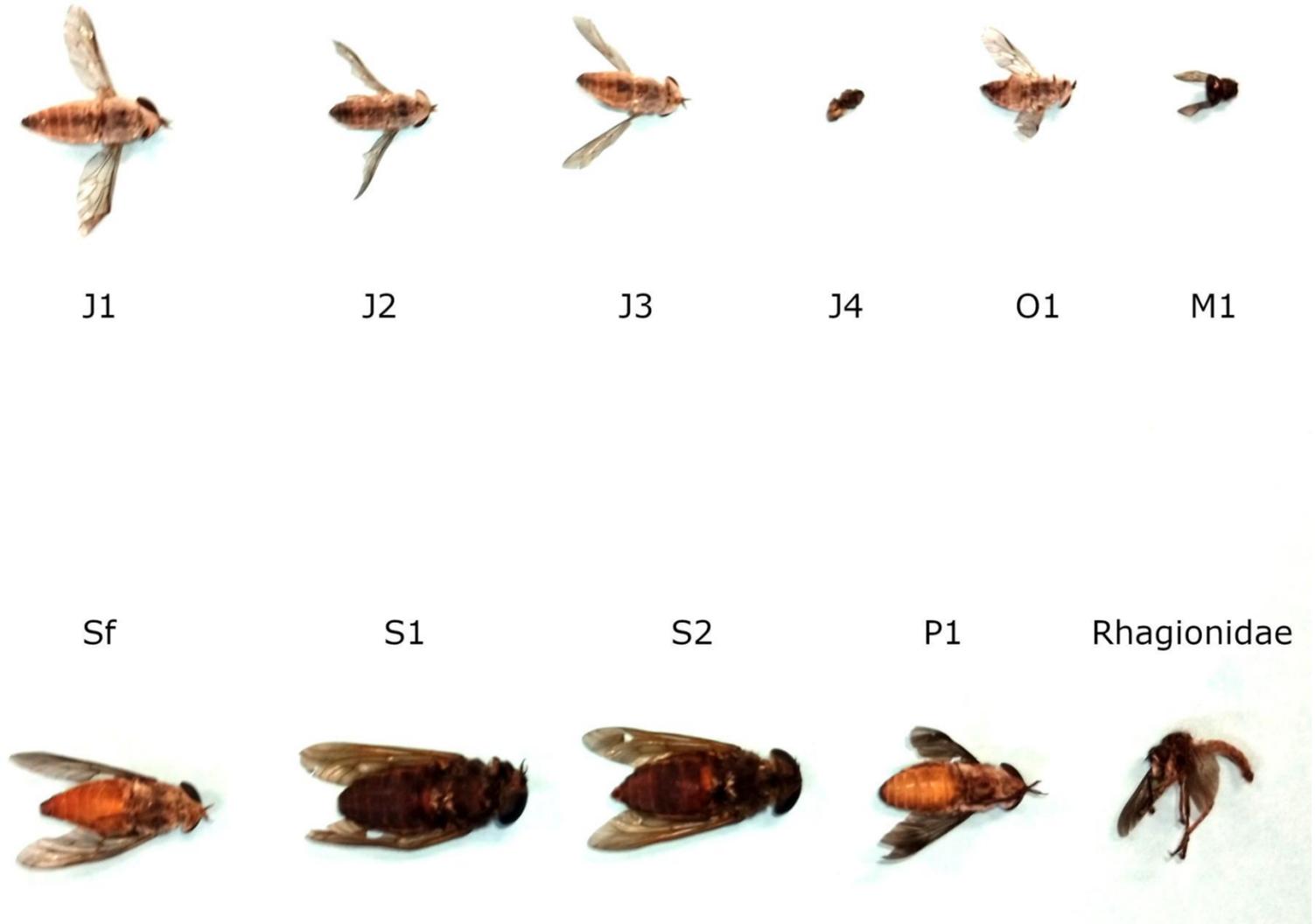


Figura 14. Muestras de Tabanidae recolectadas y un ejemplar de Rhagionidae

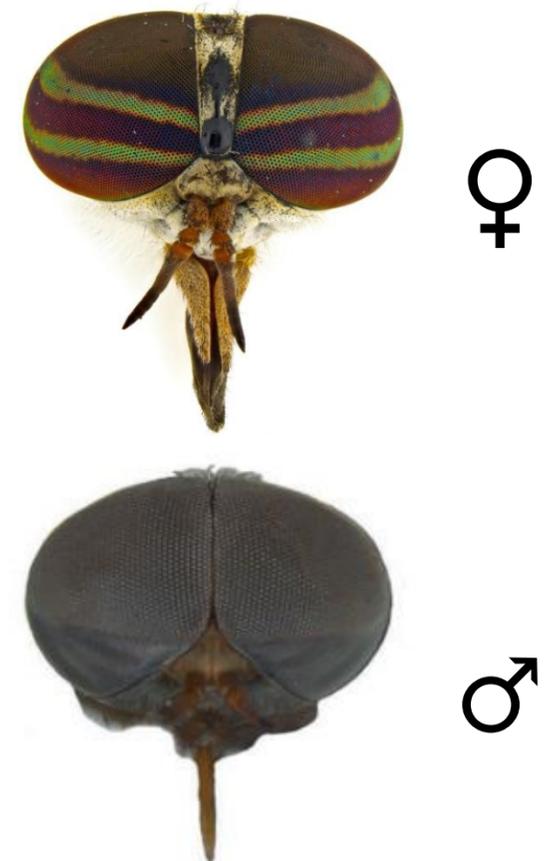
Muestra	Sexo
J1	♀
J2	♀
J3	♂
J4	♀
O1	♀
M1	♀
Sf	♀
S1	♀
S2	♀
P1	♀

Tabla 6: Sexo de las muestras recolectadas



Figura 15. Tábanos hembra identificadas del grupo muestreado

Separación de ojos como característica base de determinación de sexo post-mortem



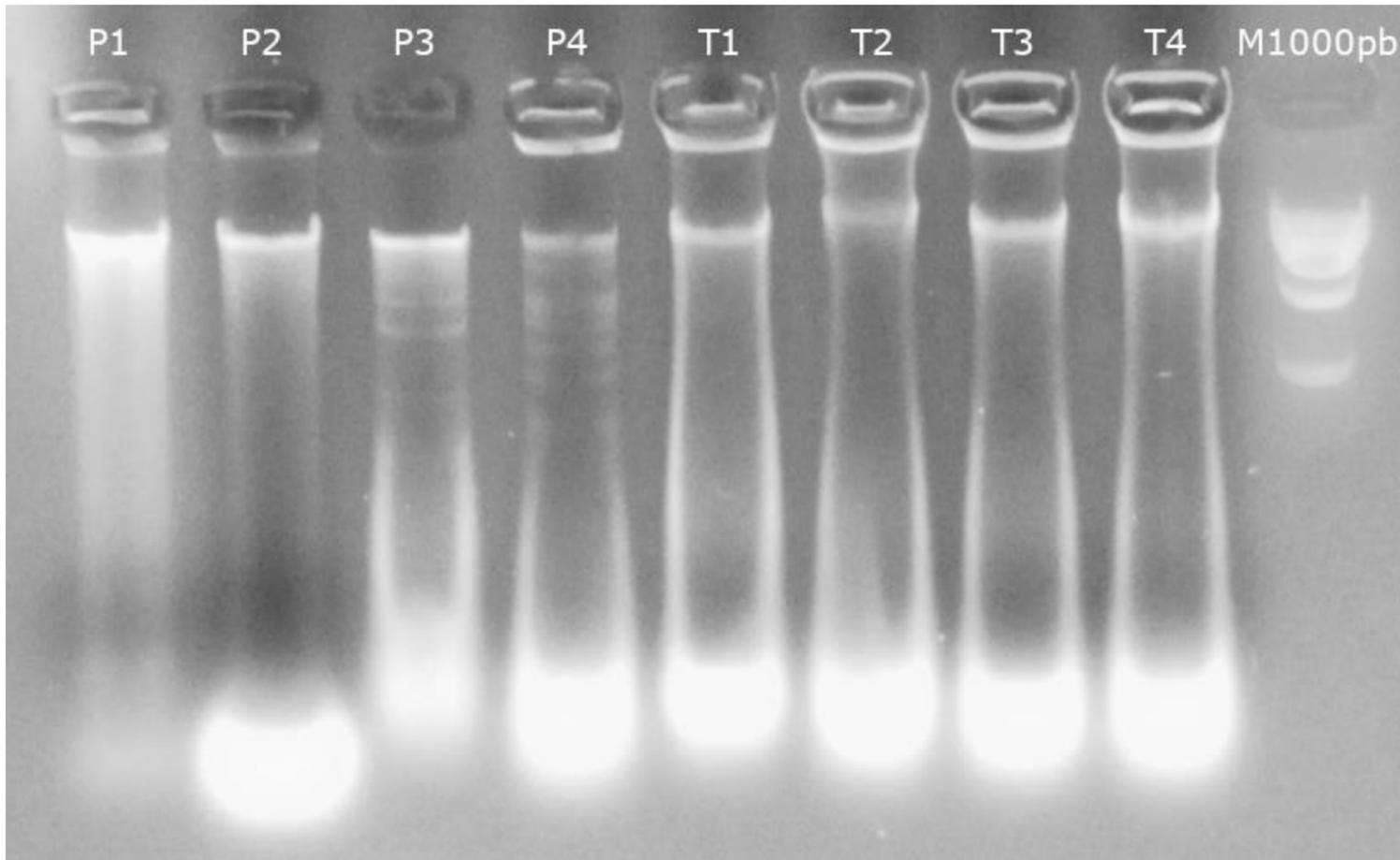


Figura 16. Protocolo de Gutiérrez-López et al., (2015) para extracción de ADN de *Musca domestica*

Fijación de 6 μ L de RNAsa posterior a la primera incubación

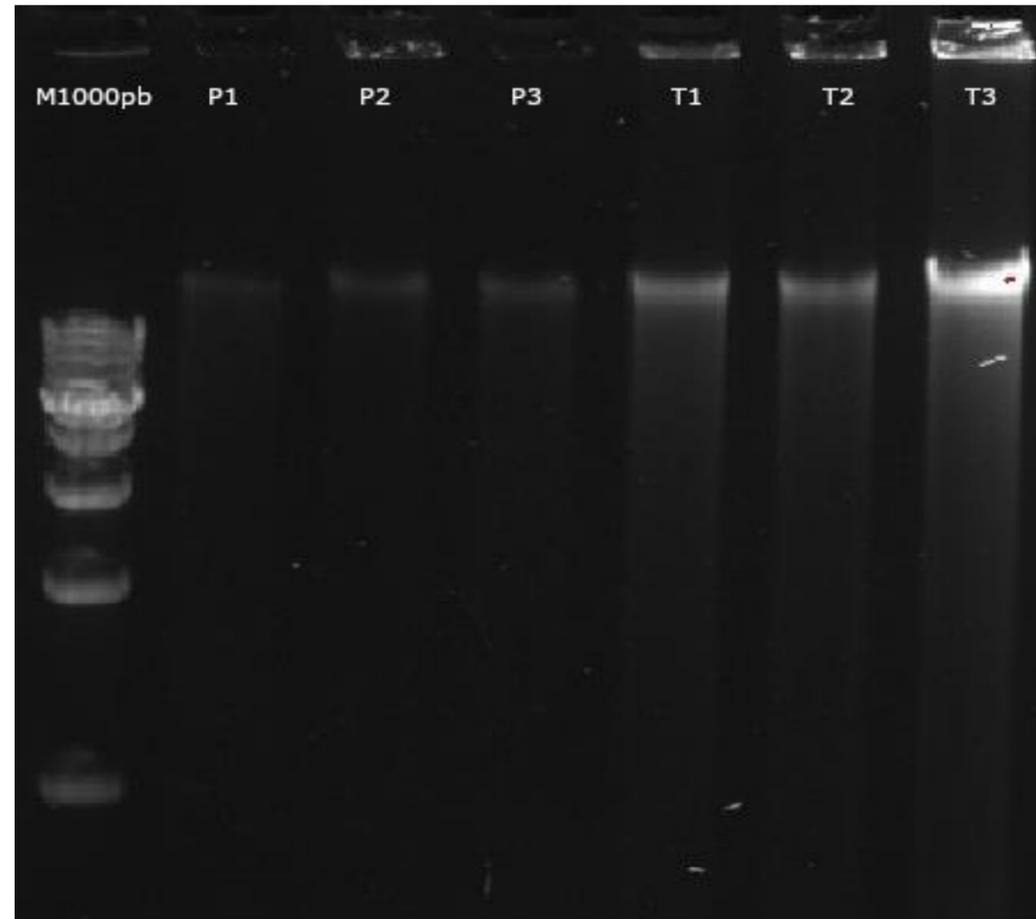


Figura 17. Gradiente de cantidad inicial del buffer de lisis (350 μ L, 600 μ L y 850 μ L) y RNAsa (3 μ L y 6 μ L)

850 μ L del buffer de lisis para molienda de la muestra



Extracción

Resultados y discusión

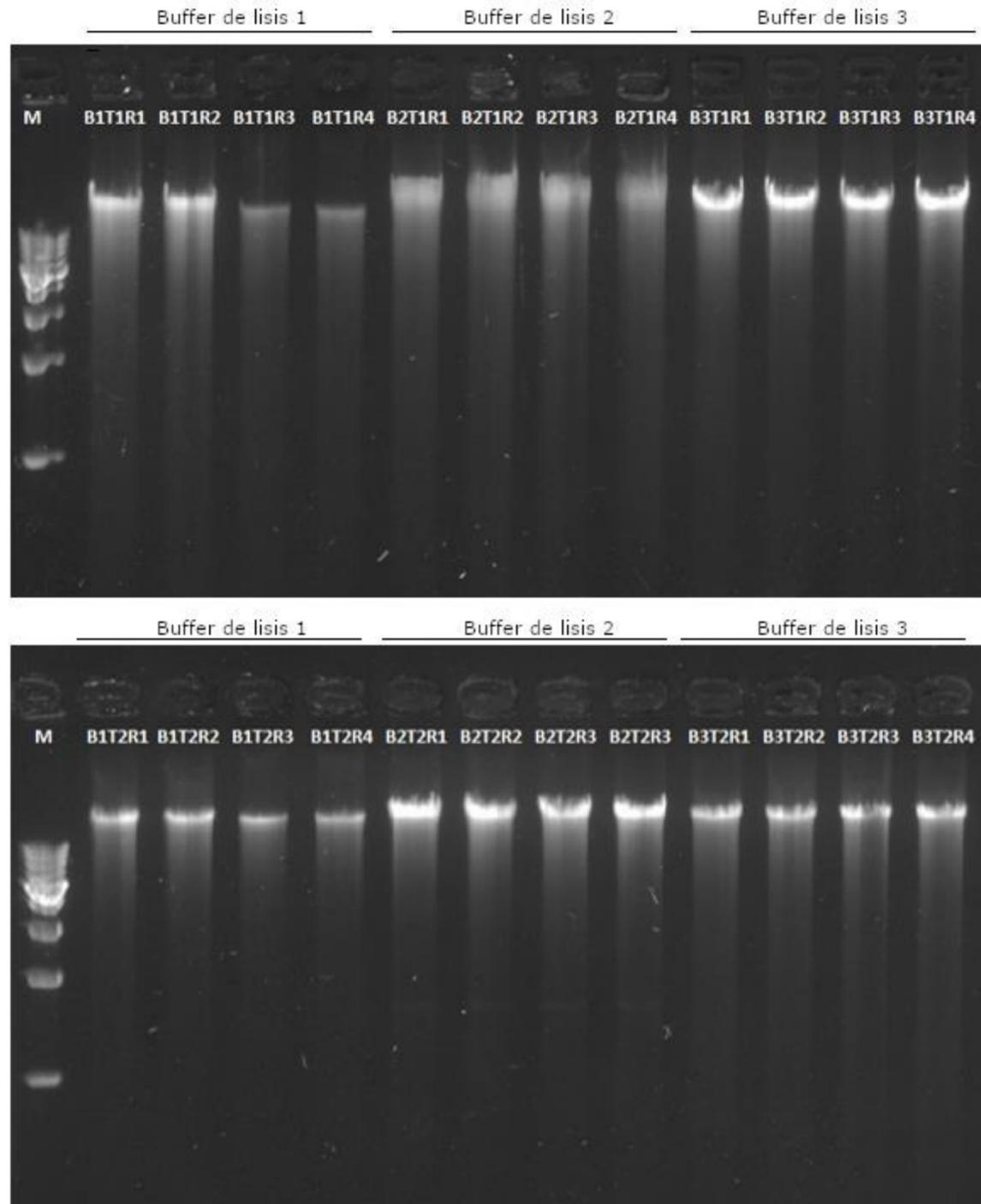


Figura 18. Variación en el protocolo de extracción de ADN

Buffer de Lisis	Agente de separación	Repetición	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)	Concentración ng/μL	Promedio
B1	T1	R1	1.739	0.9126	288.6	235.3±80
		R2	1.763	1.078	337.6	
		R3	2.01	1.081	148.1	
		R4	1.971	1.098	166.9	
	T2	R1	1.958	1.486	182.9	228.6±43.9
		R2	1.896	1.434	299.5	
		R3	2.02	1.478	227.8	
		R4	2.023	1,581	204.2	
B2	T1	R1	1.834	0.8994	323.1	315.4±31.4
		R2	1.821	0.9019	298.4	
		R3	1.853	0.9714	277.8	
		R4	1.88	0.9206	362.2	
	T2	R1	1.975	1.362	635.9	604.8±23.3
		R2	1.969	1.369	570.1	
		R3	1.96	1.367	606.8	
		R4	2.012	1.383	606.6	
B3	T1	R1	2.028	1.487	584.7	731.2±107.1
		R2	2.076	1.636	819.4	
		R3	1.992	1.447	673.9	
		R4	2.091	1.684	846.7	
	T2	R1	1.935	1.217	300	393.775±150.2
		R2	1.968	1.236	653.7	
		R3	1.915	1.19	305.6	
		R4	1.905	1.14	315.8	

Tabla 7: Cuantificación de ADN obtenido de cada tratamiento

Variable	n	D.E.	W*	P (Unilateral D)
RDUO Concentración	24	87.35	0.95	0.5053

Tabla 8: Prueba de Shapiro-Wilks para comprobar normalidad

Cumplimiento de los supuestos de normalidad, homogeneidad e independencia

Interacción significativa entre el buffer de lisis y el agente de separación de fases sobre la concentración resultante de ADN

Efecto significativo del buffer de lisis de manera individual

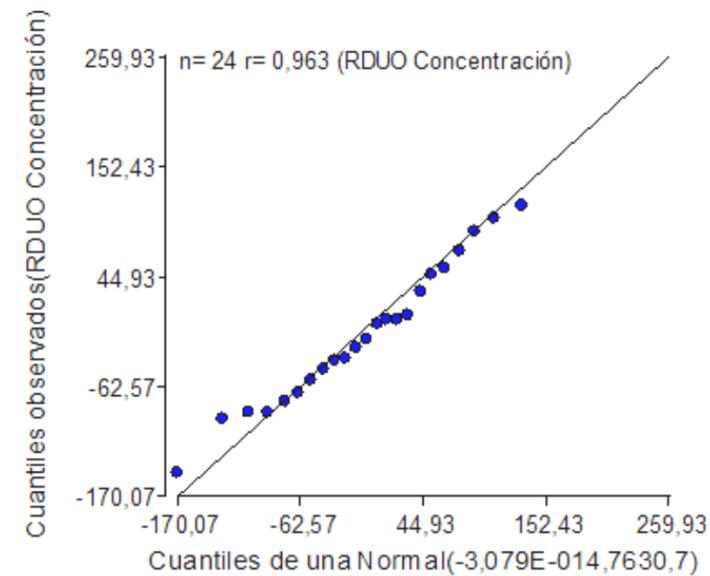


Figura 19. Q-Q Plot basado en concentraciones

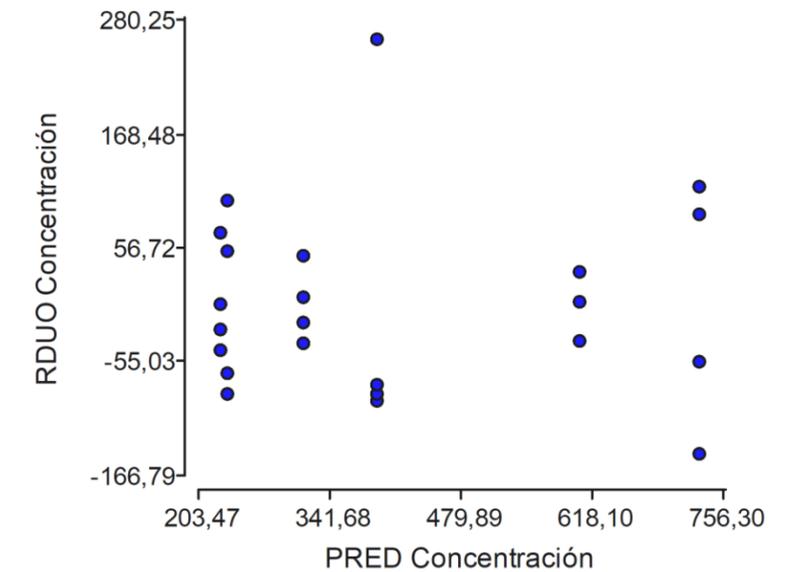


Figura 20: Diagrama de dispersión de datos

	SC	gl	F	p-valor
Modelo	853446.8	5	17.51	<0.0001
Buffer de lisis	458088	2	23.49	<0.0001
Agente de separación de fases	1989.26	1	0.2	0.6569
Interacción	393369.6	2	20.17	<0.0001
Error	175505.4	18		
Total	1028952	23		

Tabla 9: ANOVA de los tratamientos

Análisis de datos

Resultados y discusión

Tabla 10: Test de Tukey; Alfa=0.05 para los Buffers de Lisis

Buffer de Lisis	Medias	
B1	231.95	A
B2	460.11	B
B3	562.48	B

Tabla 11: Test de Tukey; Alfa=0.05 para la interacción de tratamientos

Buffer de Lisis	Agente de separación de fases	Medias	
B1	P2	228.6	A
B1	P1	235.3	A
B2	P1	315.38	A
B2	P2	393.78	A B
B3	P2	604.85	B C
B3	P1	731.18	C

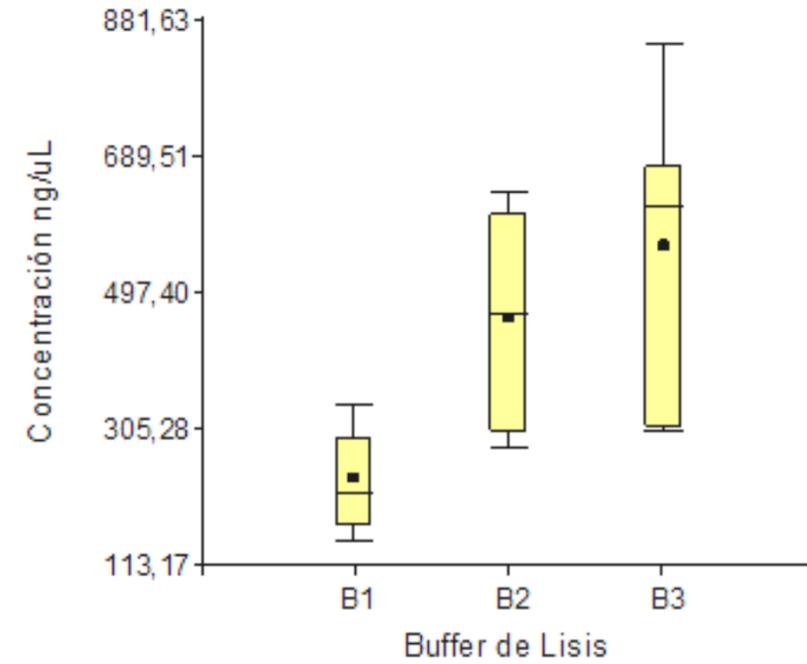


Figura 21. Diagrama de Caja y Bigotes de la concentración de ADN en función del buffer de lisis empleado

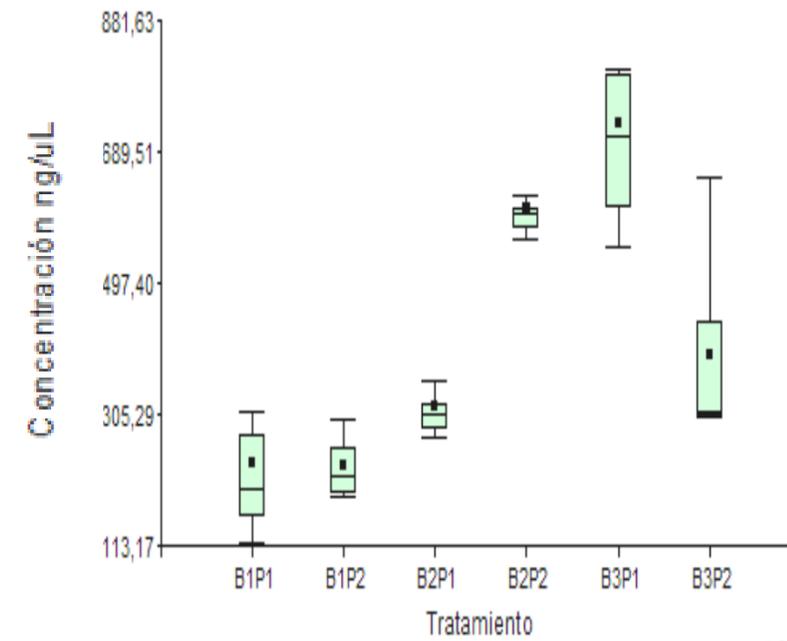


Figura 22. Diagrama de Caja y Bigotes de la concentración de ADN en función de la interacción de tratamientos



Muestra	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)	Concentraciones de DNA (ng/ μ L)
J1	1,843	1,244	1261
J2	1,7	0,9968	1039
J3	1,859	1,321	1312
J4	1,799	1,397	203,3
M1	1,848	1,85	200,8
O1	1,914	1,339	201,3
P1	1,414	1,054	2709
Sg	1,683	1,125	2971
S1	1,841	1,223	1637
S2	1,719	1,34	3008
Rhag	1,93	1,24	252,4

Tabla 12: Cuantificación de ADN obtenido en la aplicación del protocolo sobre tábanos.

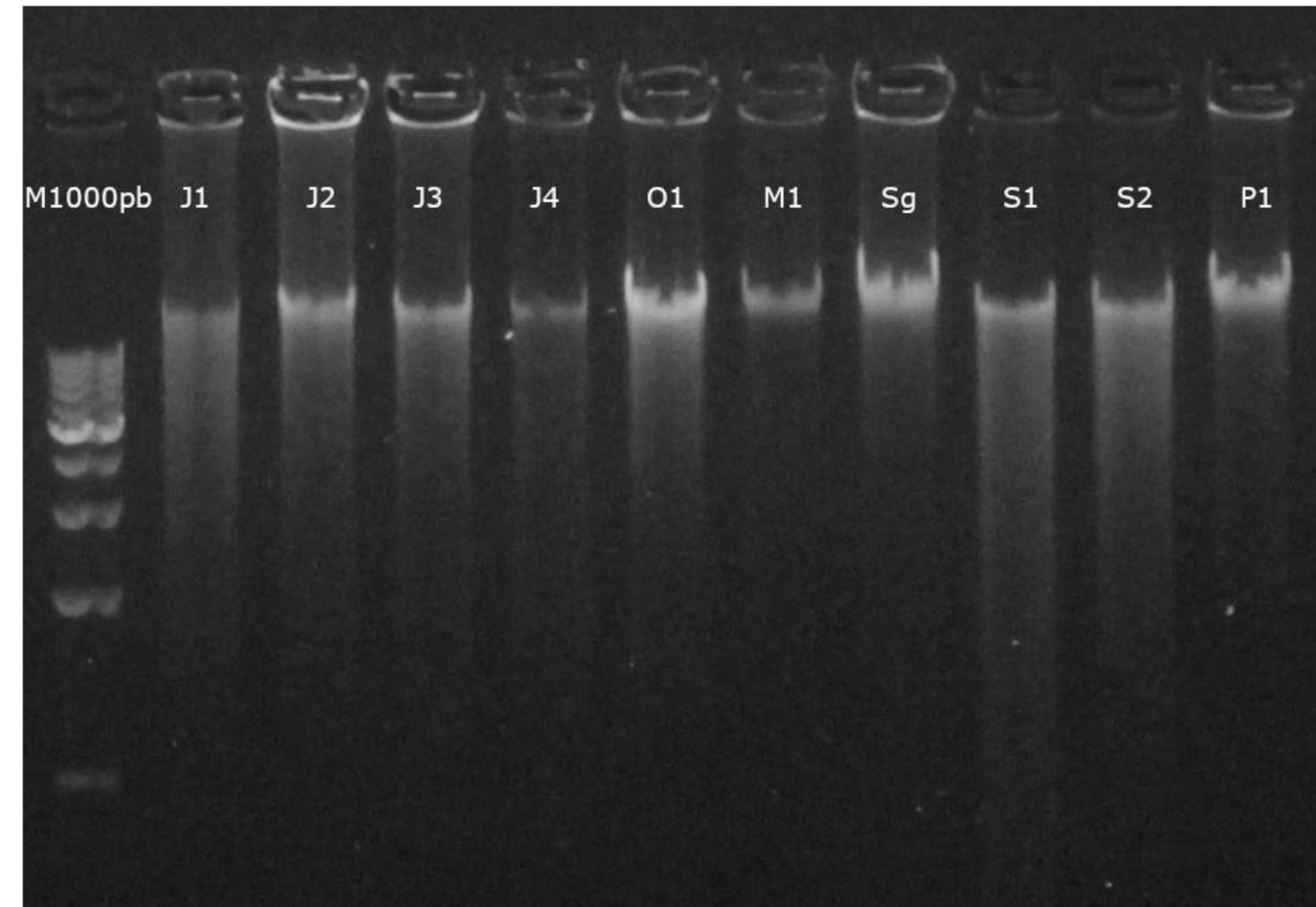
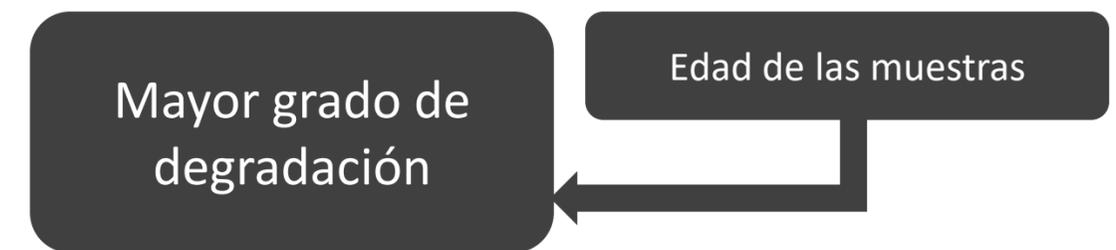
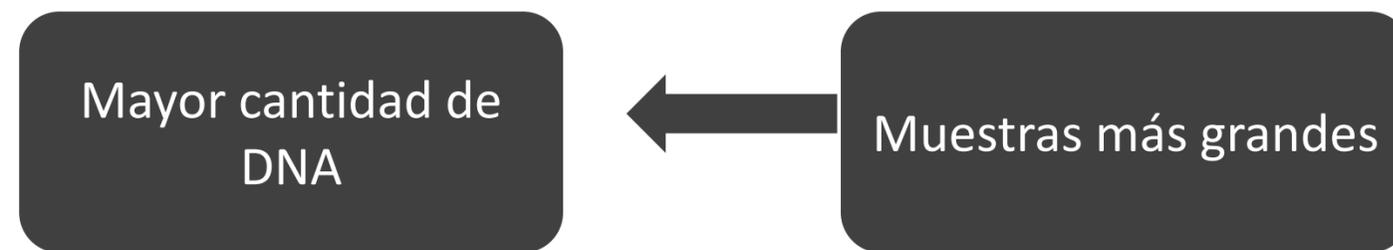


Figura 23. Electroforesis de 200ng/ μ L de las muestras de ADN extraídas



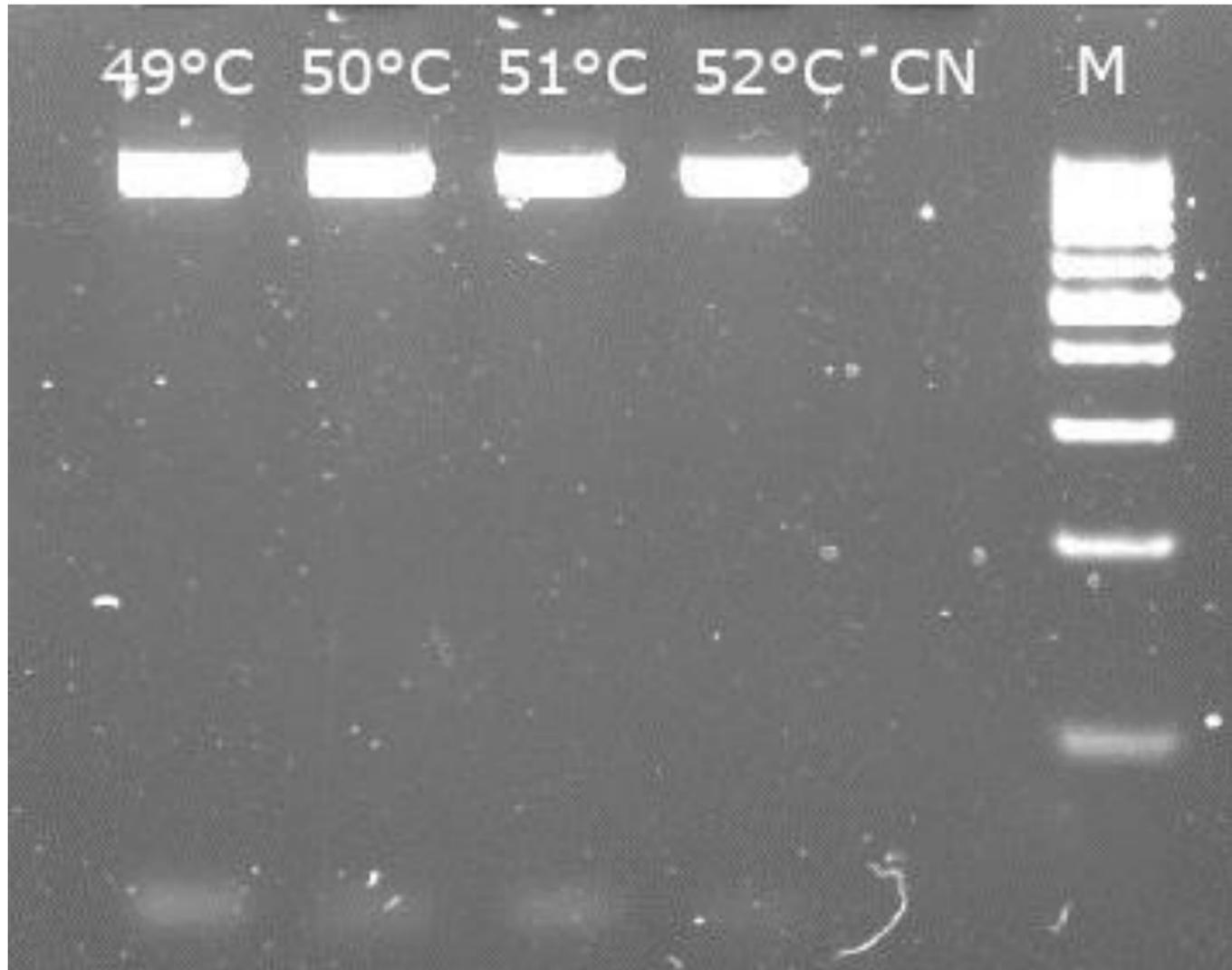


Figura 24. Gradiente de temperatura

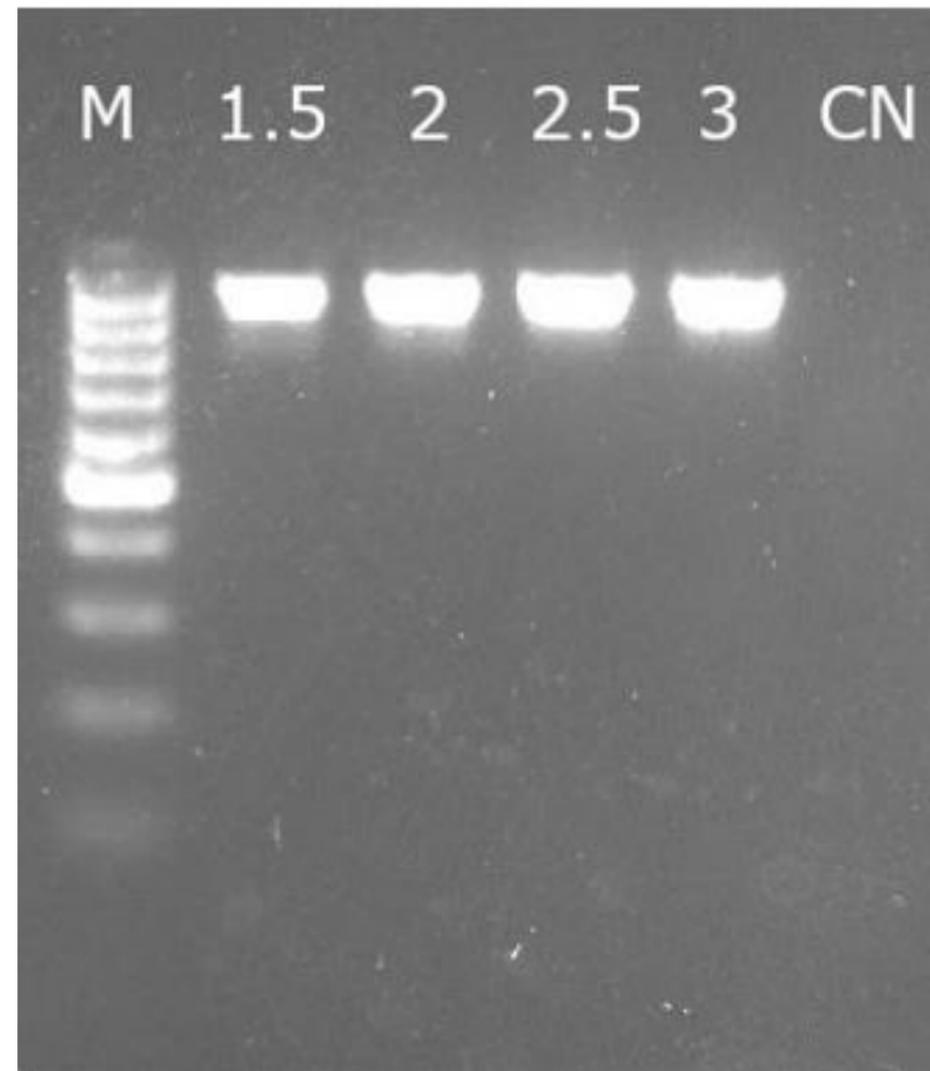


Figura 25. Gradiente de Sulfato de Magnesio

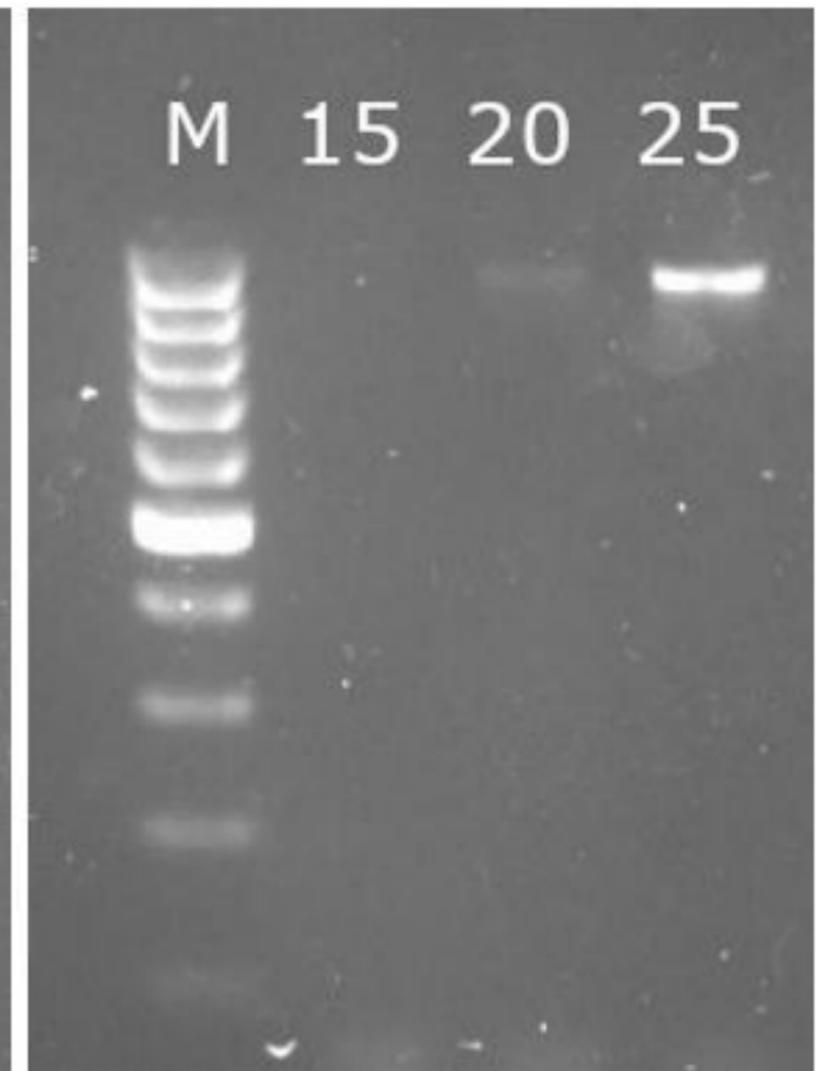


Figura 26. Gradiente de concentración de ADN

Condiciones de reacción seleccionadas:

51 °C

2.5 mM de MgSO₄

25 ng de ADN



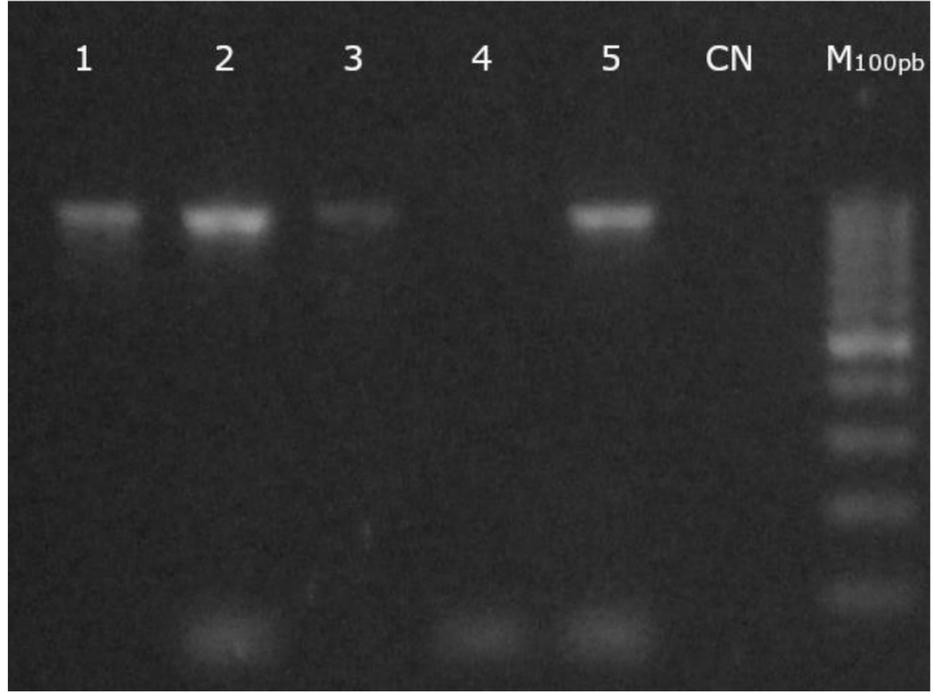


Figura 27. Protocolo aplicado sobre DNA de *Musca domestica*

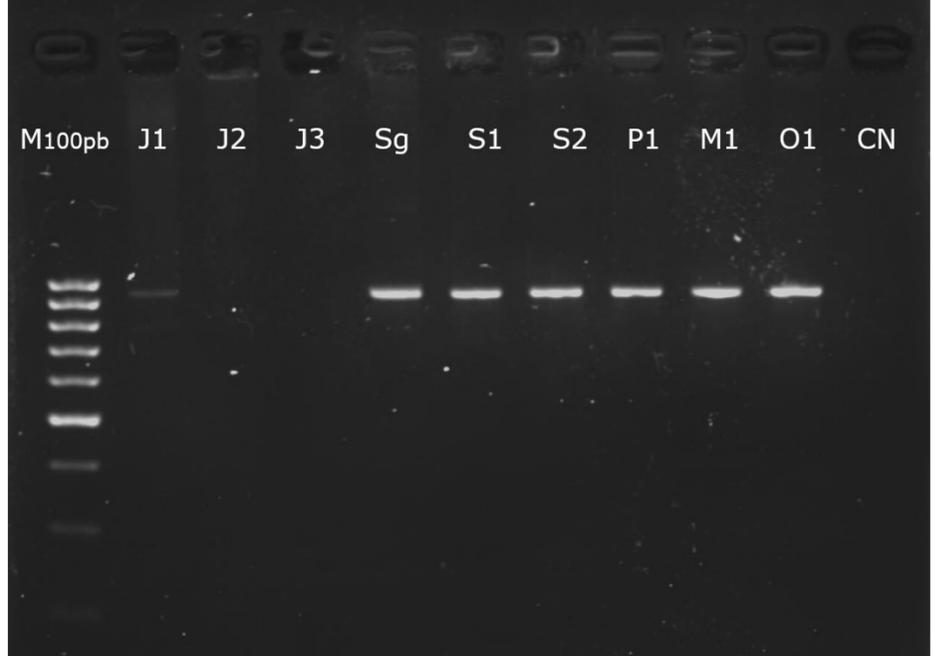


Figura 28. Protocolo aplicado sobre DNA de tábanos selectos

Muestra	Variables	Extracción de ADN	PCR
<i>Musca domestica</i>	Relación	24/24	4/5
	Rendimiento	100%	80%
<i>Tabanidae</i>	Relación	10/10	7/9
	Rendimiento	100%	77.77%

Tabla 13: Cálculos de eficiencia de los protocolos propuestos.

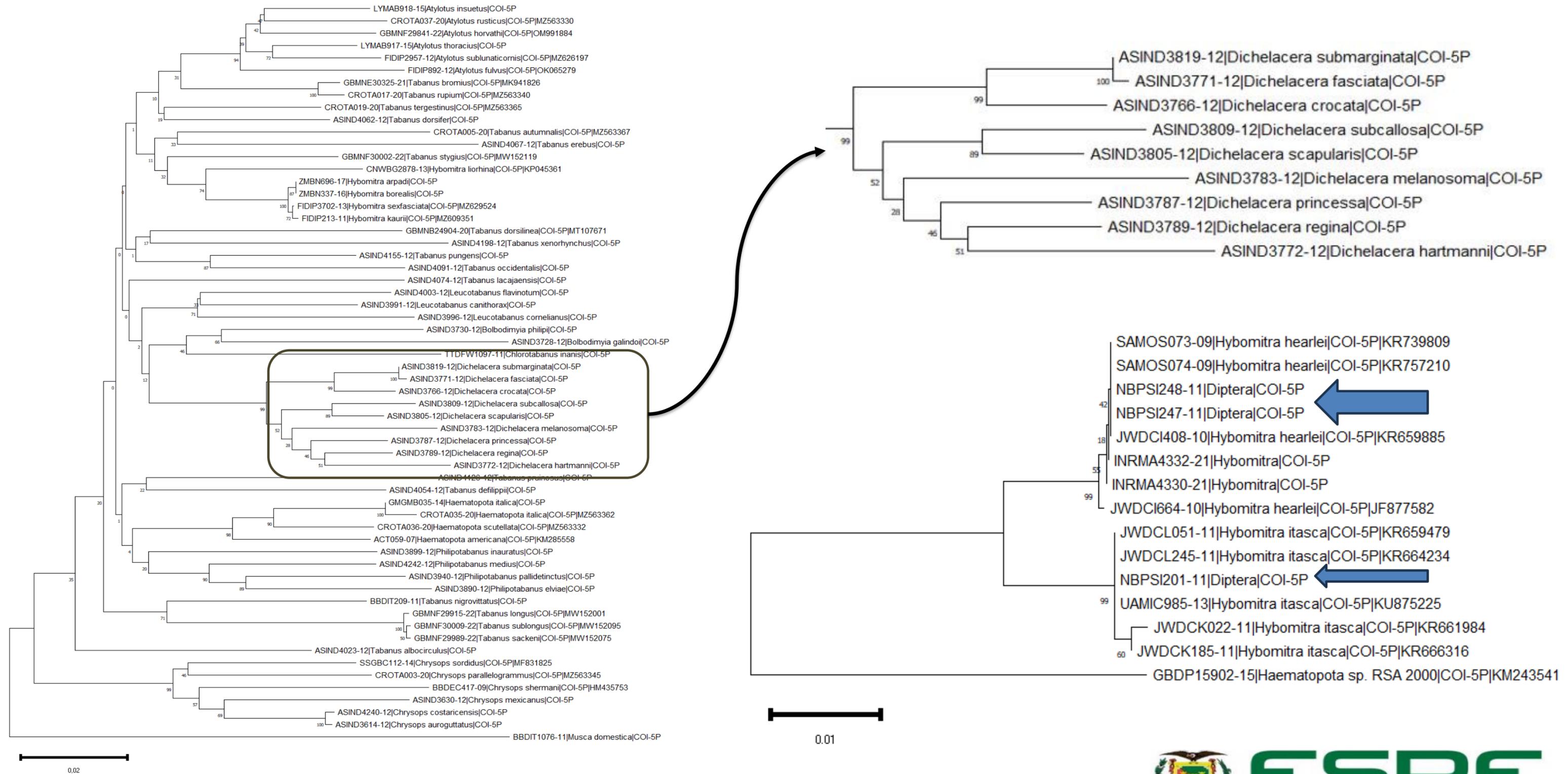
ESPECIE	BIN	ESPECIE	BIN
<i>Atylotus fulvus</i>	FIDIP892-12	<i>Tabanus albocirculus</i>	ASIND4023-12
<i>Atylotus horvathi</i>	GBMNF29841-22	<i>Tabanus autumnalis</i>	CROTA005-20
<i>Atylotus insuetus</i>	LYMAB918-15	<i>Tabanus bromius</i>	GBMNE30325-21
<i>Atylotus rusticus</i>	CROTA037-20	<i>Tabanus defilippii</i>	ASIND4054-12
<i>Atylotus sublunaticornis</i>	FIDIP2957-12	<i>Tabanus dorsifer</i>	ASIND4062-12
<i>Atylotus thoracius</i>	LYMAB917-15	<i>Tabanus dorsilinea</i>	GBMNB24904-20
<i>Bolbodimyia galindoi</i>	ASIND3728-12	<i>Tabanus erebus</i>	ASIND4067-12
<i>Bolbodimyia philipi</i>	ASIND3730-12	<i>Tabanus lacajaensis</i>	ASIND4074-12
<i>Chlorotabanus inanis</i>	TTDFW1097-11	<i>Tabanus longus</i>	GBMNF29915-22
<i>Chrysops auroguttatus</i>	ASIND3614-12	<i>Tabanus nigrovittatus</i>	BBDIT209-11
<i>Chrysops costaricensis</i>	ASIND4240-12	<i>Tabanus occidentalis</i>	ASIND4091-12
<i>Chrysops mexicanus</i>	ASIND3630-12	<i>Tabanus pruinosus</i>	ASIND4126-12
<i>Chrysops paralelogrammus</i>	CROTA003-20	<i>Tabanus pungens</i>	ASIND4155-12
<i>Chrysops shermani</i>	BBDEC417-09	<i>Tabanus rupium</i>	CROTA017-20
<i>Chrysops sordidus</i>	SSGBC112-14	<i>Tabanus sackeni</i>	GBMNF29989-22
<i>Dichelacera crocata</i>	ASIND3766-12	<i>Tabanus stygius</i>	GBMNF30002-22
<i>Dichelacera fasciata</i>	ASIND3771-12	<i>Tabanus sublongus</i>	GBMNF30009-22
<i>Dichelacera hartmanni</i>	ASIND3772-12	<i>Tabanus tergestinus</i>	CROTA019-20
<i>Dichelacera melanosoma</i>	ASIND3783-12	<i>Tabanus xenorhynchus</i>	ASIND4198-12
<i>Dichelacera princessa</i>	ASIND3787-12	<i>Musca domestica</i>	BBDIT1076-11
<i>Dichelacera regina</i>	ASIND3789-12	<i>Hybomitra kaurii</i>	FIDIP213-11
<i>Dichelacera scapularis</i>	ASIND3805-12	<i>Hybomitra liorhina</i>	CNWBG2878-13
<i>Dichelacera subcallosa</i>	ASIND3809-12	<i>Hybomitra sexfasciata</i>	FIDIP3702-13
<i>Dichelacera submarginata</i>	ASIND3819-12	<i>Leucotabanus canithorax</i>	ASIND3991-12
<i>Haematopota americana</i>	ACT059-07	<i>Leucotabanus cornelianus</i>	ASIND3996-12
<i>Haematopota italica</i>	CROTA035-20	<i>Leucotabanus flavinotum</i>	ASIND4003-12
<i>Haematopota italica</i>	GMGMB035-14	<i>Philipotabanus elviae</i>	ASIND3890-12
<i>Haematopota scutellata</i>	CROTA036-20	<i>Philipotabanus inauratus</i>	ASIND3899-12
<i>Hybomitra arpadi</i>	ZMBN696-17	<i>Philipotabanus medius</i>	ASIND4242-12
<i>Hybomitra borealis</i>	ZMBN337-16	<i>Philipotabanus pallidetinctus</i>	ASIND3940-12

Tabla 14: Especies seleccionadas y su BIN de BOLD Systems.

Análisis filogenético

Resultados y discusión

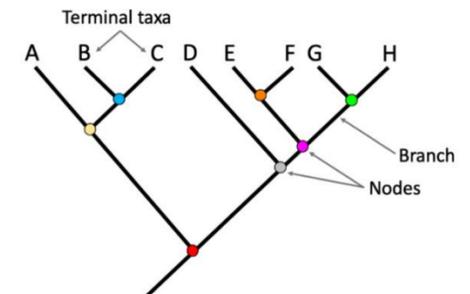
Figura 29. Árbol Neighbor-Joining de 59 especies de tábanos y *Musca domestica*



- Se estandarizó un protocolo de extracción manual de ADN, encontrando que el buffer de lisis compuesto por 50 mM de Tris-HCl, 20mM de EDTA, 400 mM de NaCl y SDS 1% funciona en sinergia con el cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (F:20.17; $p < 0.0001$), obteniendo concentraciones óptimas de ADN (731.2 ± 107.1 ng/uL) dentro del rango de pureza (A260/A280) aceptable.



- El ADN extraído de las muestras de tábano selectas permitió la amplificación de fragmentos del gen COI circundantes a los 824 pb descritos teóricamente, realizado mediante un protocolo de PCR optimizado en función de los parámetros críticos de sensibilidad (contenido de magnesio y temperatura de hibridación de los cebadores).



- El presente estudio propone un sistema de PCR Barcoding utilizando el marcador molecular COI para la identificación de especies de tábanos mediante un análisis por el método de Neighbor-Joining, donde se puede identificar especies de tábanos y agruparlas en función de la similitud de sus secuencias.





- Se sugiere siempre realizar una inspección estereomicroscópica de las muestras a trabajar ya que muchas pueden ser confundidas con tábanos a simple vista, además, se recomienda utilizar muestras frescas de tábanos (dentro de un año desde su recolección).

- Trabajar con el insecto completo proporcionará una mayor cantidad de ADN, sin embargo, se puede utilizar partes de este como patas o cabeza en caso de requerir del cuerpo para análisis morfológicos.



- Es recomendable siempre trabajar con versiones compatibles de los programas bioinformáticos, para así evitar confusión o incluso pérdida de información utilizada; considerando la información recopilada, el análisis realizado en este trabajo se podría repetir con las secuencias de especies descritas en Ecuador.





ACADÉMIE
DE RECHERCHE ET
D'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



“Establecimiento de protocolos para el uso de herramientas moleculares en el análisis de la diversidad de insectos de la familia Tabanidae (vectores de enfermedades hemotrópicas)”



Grupo de Investigación en
Sanidad Animal y Humana

- Sarah Martin Solano, Ph.D.
- Cristina Cholota, Magister (C).

- Laboratorio de Biotecnología Animal – ESPE
- Laboratorios de Investigación – IASA
- Proyecto BruTryp

- Familia y amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA