



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

Nickelsen Cordovez, Uwe Jens

Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

Martin Solano, Sarah Ph.D.

25 de Agosto de 2023

## Resultados de la herramienta para análisis de similitud de contenidos



### Uwe\_Nickelsen\_Tesis\_Borrador\_25082...

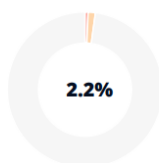
#### Scan details

Scan time:  
August 28th, 2023 at 9:51 UTC

Total Pages:  
45

Total Words:  
11037

#### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.4%	47
Minor Changes	0%	0
Paraphrased	1%	114
Omitted Words	32.5%	3587

#### AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text



Firmado electrónicamente por:  
SARAH MARTIN SOLANO

**Martin Solano, Sarah PhD.**

**Directora del proyecto de integración curricular**

**C.C.:1727221721**



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Biotecnología**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Optimización de las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia Tabanidae del marcador molecular COI”** fue realizado por el señor **Nickelsen Cordovez, Uwe Jens**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 25 de Septiembre de 2023



Firmado electrónicamente por:  
**SARAH MARTIN SOLANO**

**Martin Solano, Sarah PhD.**

**Directora del proyecto de integración curricular**

**C.C.:1727221721**



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Nickelsen Cordovez, Uwe Jens**, con cédula de ciudadanía n° 0503621948, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Optimización de las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia Tabanidae del marcador molecular COI”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 25 de Septiembre de 2023

.....  
**Nickelsen Cordovez, Uwe Jens**

C.C.: 0503621948



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

**Autorización de Publicación**

Yo, **Nickelsen Cordovez, Uwe Jens**, con cédula de ciudadanía n° 0503621948, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular. **Título: "Optimización de las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia Tabanidae del marcador molecular COI"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 25 de Septiembre de 2023**

**Nickelsen Cordovez, Uwe Jens**

C.C.: 0503621948

## Dedicatoria

Este proyecto de investigación va dedicado principalmente a mi abuelo, quien me mostró el tipo de persona en quien quiero y pienso convertirme, siendo mi mayor ejemplo de perseverancia, fuerza y determinación. A mi padre, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. A mi madre, por todo su cariño proporcionado. A mi hermano Erich, la persona en quien más confianza tengo, y a su vez, quien mayores expectativas me genera.

A aquellos familiares y amigos que han aportado en mi vida y me han dado razones para no desviarme de mis objetivos.

Finalmente, a Dios, por poner a todos aquellos ya mencionados en mi camino y darme fuerza cuando más lo he necesitado.

Uwe Jens Nickelsen Cordovez.

## **Agradecimiento**

Primeramente, agradezco a la Dra. Sarah Martin por la posibilidad otorgada para realizar este trabajo, su disponibilidad de tiempo y colaboración en cada instancia durante el desarrollo de este proyecto de investigación. De igual manera, a la Ing. Cristina Cholota por su apoyo y asesoramiento en las actividades trabajadas en el laboratorio, además de todos los conocimientos que me proporcionó. Agradezco rotundamente al laboratorio de Biotecnología Animal y el agradable espacio de trabajo que siempre lograron mantener quienes lo conforman.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y a quienes son parte del departamento de Ciencias de la Vida por todo lo enseñado hasta la fecha, especialmente a aquellos docentes que pusieron su mayor esfuerzo en su arduo trabajo.

Quiero agradecer a mi familia, por todo el apoyo que me brindaron estando lejos de ellos, y a aquellos amigos que me hicieron sentir en casa, volviendo esta etapa amena y especial. De igual modo, a aquellos que incluso estando a cientos de kilómetros lograron estar conmigo en los momentos más complejos.

Poner todos los nombres de quienes han marcado esta etapa sería demasiado extenso, por lo que dejo en este trabajo la constancia de las maravillosas personas que me he encontrado en este camino, gracias por todo.

Uwe Jens Nickelsen Cordovez.

## Índice de contenidos

<b>Resultados de la herramienta para análisis de similitud de contenidos .....</b>	<b>2</b>
<b>Certificación .....</b>	<b>3</b>
<b>Responsabilidad de autoría.....</b>	<b>4</b>
<b>Autorización de publicación.....</b>	<b>5</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimiento .....</b>	<b>7</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo I .....</b>	<b>16</b>
Antecedentes.....	16
Formulación del problema .....	16
Justificación .....	18
Hipótesis .....	18
Objetivos.....	19
<i>General</i> .....	19
<i>Específicos</i> .....	19
<b>Capítulo II .....</b>	<b>20</b>
Revisión de la literatura.....	20
<i>Familia Tabanidae</i> .....	20



<i>Taxonomía</i> .....	22
<i>Ciclo de vida</i> .....	22
<i>Problemáticas relacionadas a su presencia</i> .....	24
<i>Clasificación de las especies descritas en el país</i> .....	25
<i>Desafíos de la taxonomía tradicional</i> .....	26
<i>PCR Barcoding</i> .....	26
<i>Citocromo c oxidasa I (COI) como marcador molecular</i> .....	29
<b>Capítulo III</b> .....	<b>30</b>
Materiales y Métodos.....	30
<i>Colecta de muestras</i> .....	30
<i>Determinación de la familia Tabanidae a partir de características morfológicas de la muestra</i> .....	30
<i>Estandarización de un protocolo manual de extracción de ADN</i> .....	31
<i>Protocolo definido</i> .....	32
<i>Análisis estadístico</i> .....	34
<i>Optimización de una reacción de PCR para el marcador molecular COI</i> .....	34
<i>Análisis filogenético</i> .....	37
<b>Capítulo IV</b> .....	<b>38</b>
Resultados.....	38
<i>Determinación de las muestras a utilizar</i> .....	38
<i>Estandarización del protocolo de ADN</i> .....	40
<i>Análisis de los protocolos de extracción de ADN planteados</i> .....	41

<i>Extracción de ADN de los tábanos selectos</i> .....	48
<i>Optimización del protocolo de PCR</i> .....	49
<i>PCR con las muestras de ADN extraído</i> .....	50
<i>Determinación de la eficiencia de los protocolos trabajados</i> .....	51
<i>Secuencias seleccionadas para análisis filogenético</i> .....	52
<i>Desarrollo del árbol filogenético</i> .....	53
<b>Capítulo V</b> .....	<b>55</b>
Discusión.....	55
<b>Capítulo VI</b> .....	<b>58</b>
Conclusiones.....	58
Recomendaciones.....	58
<b>Capítulo VI</b> .....	<b>60</b>
Bibliografía.....	60

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Variables definidas para la estandarización del protocolo de extracción de ADN.....	32
<b>Tabla 2.</b> Volúmenes de reactivos fijados para el trabajo con distinto material de muestra. ....	34
<b>Tabla 3.</b> Variables definidas para la PCR .....	35
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones de reactivos utilizadas en la mastermix para la PCR.....	36
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de reacción de la PCR.....	36
<b>Tabla 6.</b> Cebadores utilizados para la amplificación del gen COI en tábanos. ....	37
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones, pureza (A260/A280) y (A260/A230) para cada tratamiento aplicado. ....	43
<b>Tabla 8.</b> Prueba de Shapiro-Wilks con los errores obtenidos de las concentraciones. ....	44
<b>Tabla 9.</b> ANOVA (SC tipo I) basado en las concentraciones de ADN.....	46
<b>Tabla 10.</b> Test de Tukey; Alfa=0.05 para los Buffers de Lisis .....	46
<b>Tabla 11.</b> Test de Tukey; Alfa=0.05 para la interacción entre el Buffer de lisis y el Agente de separación de fases .....	47
<b>Tabla 12.</b> Cuantificación de ADN de las muestras de tábano.....	48
<b>Tabla 13.</b> Eficiencia de los protocolos fijados sobre las muestras trabajadas según el protocolo de extracción de ADN y de PCR.....	52
<b>Tabla 14.</b> Especies utilizadas en el análisis filogenético, recuperadas de BOLD Systems.....	52

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Morfología típica de un tábano adulto.....	20
<b>Figura 2.</b> Ala característica de Tabanomorphae .....	21
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de Chysops sp. ....	23
<b>Figura 4.</b> Morfología típica de una larva de tábano.....	23
<b>Figura 5.</b> Morfología típica de una pupa de tábano .....	24
<b>Figura 6.</b> Bancos de especímenes de tábanos .....	28
<b>Figura 7.</b> Aporte de los países a la secuenciación de tábanos.....	29
<b>Figura 8.</b> Características morfológicas para distinción de especies pertenecientes a la familia Tabanidae .....	30
<b>Figura 9.</b> Tabanomorfos. A) Rhagionidae. B) Tabanidae .....	31
<b>Figura 10.</b> Tábanos encontrados entre las muestras almacenadas.....	38
<b>Figura 11.</b> Determinación de sexo de los tábanos mediante la morfología de la cabeza .....	39
<b>Figura 12.</b> Estructura del ala de todas las muestras seleccionadas.....	39
<b>Figura 13.</b> ADN extraído mediante la aplicación del buffer de lisis 1 y el tratamiento P .....	40
<b>Figura 14.</b> ADN extraído mediante la aplicación del buffer de lisis 1 y el tratamiento P posterior a la aplicación de RNAsa.....	41
<b>Figura 15.</b> ADN extraído mediante la aplicación de cada protocolo de extracción propuesto .....	42
<b>Figura 16.</b> Diagrama Q-Q plot.....	44
<b>Figura 17.</b> Diagrama de dispersión de los PRED vs RDUO de las concentraciones .....	45
<b>Figura 18.</b> Diagrama de Caja y Bigotes de la concentración de ADN en función del buffer de lisis empleado.....	47

<b>Figura 19.</b> Diagrama de Caja y Bigotes de la concentración de ADN en función del tratamiento empleado .....	48
<b>Figura 20.</b> Electroforesis de 200ng/ $\mu$ L de las muestras de ADN extraídas.....	49
<b>Figura 21.</b> Amplicones del gen COI con la aplicación de un gradiente de temperatura. ....	49
<b>Figura 22.</b> Amplicones del gen COI con (A) la aplicación de un gradiente de magnesio y (B) un gradiente de concentración de ADN.....	50
<b>Figura 23.</b> Amplificación del gen COI en cinco muestras de <i>Musca domestica</i> .....	51
<b>Figura 24.</b> Amplificación del gen COI en las muestras de tábanos seleccionadas.....	51
<b>Figura 25.</b> . Árbol filogenético de individuos de la familia Tabanidae.....	54

## Resumen

La familia Tabanidae son considerados insectos de alto impacto económico en el mundo debido a su dieta hematófaga, siendo estos además vectores de múltiples enfermedades de afección directa al ganado bovino, ovino y bufalino. La presente investigación trata el establecimiento de un protocolo para la evaluación molecular de especies de tábanos presentes en Ecuador mediante un protocolo de PCR Barcoding del gen COI. Se trabajaron muestras de dípteros recolectadas en las provincias de Pichincha, Orellana, Manabí, Napo, Sto. Domingo de los Tsáchilas, Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura, estableciendo un protocolo de extracción de ADN mediante variaciones del buffer de lisis y el agente de separación de fases, denotando una sinergia entre el buffer compuesto por 50 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS y el cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. Se amplificó el gen COI mediante una PCR variando la temperatura de hibridación de los cebadores, la cantidad de magnesio en la reacción y la cantidad de ADN, fijándose los mejores amplicones a 51°C, 2.5 mM de MgSO<sub>4</sub> y 25 ng de ADN. Mediante un análisis Neighbor Joining a partir de secuencias del gen COI de tábanos, obtenidas de bases de datos, se demostró que la técnica permite discernir a nivel de género y especie a los insectos de esta familia. De este modo se establece una técnica estandarizada para un análisis taxonómico de esta Familia en Ecuador.

*Palabras clave:* Hematófagos, Barcoding, Taxonomía, Tábanos

### **Abstract**

The family Tabanidae are considered insects of high economic impact in the world due to their hematophagous diet, being also vectors of multiple diseases of direct affection to cattle, sheep and buffalo. The present research deals with the establishment of a protocol for the molecular evaluation of horsefly species present in Ecuador by means of a PCR Barcoding protocol of the COI gene. Diptera samples collected in the provinces of Pichincha, Orellana, Manabí, Napo, Sto. Domingo de los Tsáchilas, Tungurahua, Cotopaxi and Imbabura, establishing a DNA extraction protocol using variations of the lysis buffer and phase separation agent, denoting a synergy between the buffer composed of 50 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% SDS and 24:1 chloroform/isoamyl alcohol. The COI gene was amplified by PCR by varying the hybridization temperature of the primers, the amount of magnesium in the reaction and the amount of DNA, with the best amplicons being set at 51°C, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub> and 25 ng of DNA. By means of a Neighbor Joining analysis from COI gene sequences of horseflies, obtained from databases, it was demonstrated that the technique allows discerning at genus and species level the insects of this family. Thus, a standardized technique for a taxonomic analysis of this family in Ecuador is established.

*Keywords:* Hematophagous, Barcoding, Taxonomy, Tabanids

## Capítulo I

### Antecedentes

La historia investigativa sobre la familia Tabanidae en el país inicia con Campos (1952), quien cita inicialmente veinte especies en el país, continuamente, Patrick y Hays (1968) describen 27 especies de tábanos para la amazonía ecuatoriana. Próximamente el Dr. Jaime Buestán reporta 18 especies, de las cuales una era cita nueva y dos fueron nuevas para la ciencia, pero es hasta el año 1986, con el trabajo de Fairchild y León, donde se presenta por primera vez una lista preliminar de 121 especies, de las cuales 5 fueron erróneamente atribuidas y 7 consideradas dudas según los mismos autores (Cárdenas & Vieira, 2005). Un posterior aporte fue el dado por Fairchild y Burger en 1994, presentándose nuevos datos de captura de 42 especies, 31 de las cuales se citan por primera vez.

La aparición de nuevas especies es algo recurrente en Ecuador, pues este uno de los países denominados megadiversos a nivel mundial (Cárdenas & Vieira, 2005), al mantener varias zonas biogeográficas comunes con Colombia, Perú, Venezuela y Brasil, tal como el Pacífico, Desierto, Altoandino, Páramo y Amazonía (Koch, 2008), se mantiene una alta probabilidad de compartir parte de la biota con estos y la posibilidad de confundir una nueva especie con un fenotipo distinto (Fairchild & Wilkerson, 1981)

### Formulación del problema

Los tábanos son dípteros hematófagos que causan pérdidas directas a la producción pecuaria a nivel mundial (Lessard et al., 2013), por su prevalencia en casi todos los territorios y afecciones causadas a los animales (Krinsky, 1976), siendo estas de forma directa al causar irritación, estrés y pérdida de sangre (Lucas Fonseca, 2019), o de forma indirecta mediante transmisión de múltiples ectoparásitos y



enfermedades al actuar como vector, conllevando así a gastos en campañas de control (Carvajal L., 2020).

Las especies pertenecientes a la familia Tabanidae se encuentran ampliamente distribuidos por el mundo (Lessard et al., 2013), sin embargo, su estudio ha sido descuidado pese a que estos son descritos como económicamente relevantes (Cárdenas & Vieira, 2005). La capacidad de vuelo de los tábanos es de uno a dos kilómetros por día, alcanzando velocidades de hasta cinco metros por segundo (Dale & Axtell, 1975). Las hembras son hematófagas que se alimentan de tres a cuatro veces por día con una picadura dolorosa y persistente, causando que los animales interrumpen este proceso, de modo que el tábano requerirá de varios animales para completar una comida, convirtiéndose así en un considerable transmisor mecánico de agentes infecciosos (Mulandane et al., 2020; Najera-Cortazar et al., 2023; Sevidzem et al., 2021).

Su papel como vector representa importancia tanto para la salud humana (Baldacchino et al., 2014), como animal (Krinsky, 1976). Sin embargo, no todos los integrantes de la familia Tabanidae presentan el mismo potencial de transmisión de patógenos, pues las características anatómicas involucradas en la cantidad de sangre que pueden transportar en su aparato bucal, su zumbido y la capacidad de vuelo diaria de estos, varían (Lucas Fonseca, 2019).

Ante ello, el conocimiento y determinación de especies locales se convierte en un factor crítico para su control (Flores-Pacheco et al., 2018), lamentablemente, los estudios desarrollados en el país se han limitado únicamente a su caracterización morfológica y un análisis taxonómico tradicional (Cárdenas & Vieira, 2005). La implementación de métodos moleculares para su caracterización filogenética podría optimizar este proceso y entregar resultados que complementarían la caracterización fenotípica de los individuos analizados.

## **Justificación**

Los tábanos son dípteros del suborden Brachycera que pueden presentar variaciones de color, marcas en el cuerpo y tamaños entre 6 a 33 mm (Carvajal L., 2020). Estas características han causado que se cometan múltiples errores al describir nuevas especies y clasificarlas, que para su valoración se requiere de altos conocimientos morfológicos y taxonómicos referentes a esta familia (Cárdenas & Vieira, 2005). De este modo, el trabajo de control se ha visto comprometido por la ineficacia de repelentes o la manipulación de hábitats no acordes a las especies problemáticas (Foil & Hogsette, 1994).

El establecimiento de diversas herramientas moleculares para facilitar la determinación precisa de los vectores pertenecientes a la familia Tabanidae presentes en nuestro territorio permitiría proponer una mayor cantidad de estrategias de control para estos, evitando parcialmente la afectación a las especies de interés productivo como lo son el ganado ovino, bovino y bufalino (Alvarado Ramos, 2022). Métodos como el ADN barcoding ya han sido empleados para la identificación de especies de tábanos en ciertas partes del mundo (Banerjee et al., 2015; Cywinska et al., 2010), sin embargo, Ecuador no consta con una base de datos genética desarrollada para las especies locales ni estudios recientes sobre métodos moleculares aplicados a esta problemática, por la creación de una línea base permitirá el análisis rápido y preciso de estos insectos.

## **Hipótesis**

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

## **Objetivos**

### ***General***

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

### ***Específicos***

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN mediante variaciones en los pasos críticos del proceso para 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.

## Capítulo II

### Revisión de la literatura

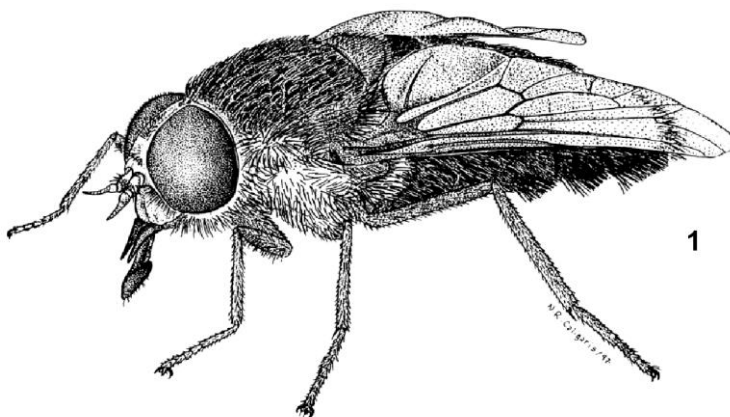
#### *Familia Tabanidae*

Los tábanos, también conocidos como moscas de caballo (horseflies), son insectos pertenecientes al suborden Brachycera entre los dípteros (Changbunjong et al., 2021), presentes en todos los continentes del mundo a excepción de la Antártida. Se han descrito alrededor de 4 300 especies a nivel mundial (Lessard et al., 2013).

Tabanidae son moscas con un rango de longitud entre 6 a 33 mm, con cuerpos generalmente marrones, negros o grises, con patrones de alas pálidas de matiz amarillo, verde o azul metalizado (Mugasa, Villinger, Gitau, Ndungu, Marc Ciosi, et al., 2018). Esta familia se caracteriza por su cabeza grande y prominente probóscide, calípteros grandes y pulviniformes y ausencia de cerdas en el cuerpo (Changbunjong et al., 2021). (Venación del ala únicamente compartida con la familia Rhagionidae en Tabanomorpha).

#### **Figura 1**

*Morfología típica de un tábano adulto. Tomado de: (Coscarón & Papavero, 2014)*

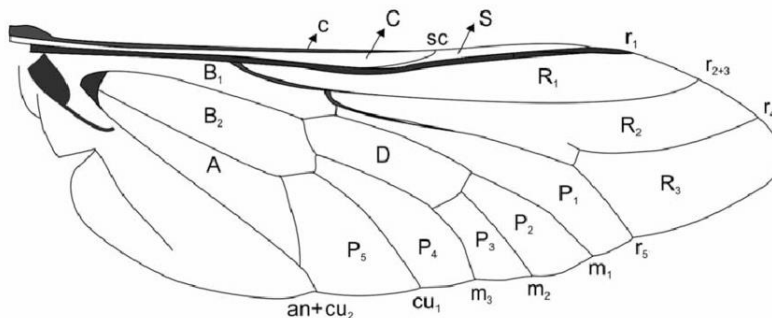


Los tábanos adultos poseen ojos compuestos prominentes, antenas cortas compuestas compuestas de tres segmentos y cuerpos aplanados (Buestán, 1980). En hembras, los ojos se encuentran ligeramente separados mientras que en machos estos se encuentran casi acoplados. El segmento terminal de la antena suele variar en función del género y suele ser una de las principales características para la clasificación taxonómica de las mismas (Capinera, 2008).

Las larvas de esta familia son largas y cilíndricas, de cabeza pequeña y tienen 12 segmentos. Además, poseen un sifón especializado para la respiración conocido como órgano de Graber (Carvajal L., 2020). En estadio de pupa suelen ser visibles las alas y cabezas, con un segmento abdominal móvil y prolongaciones de tipo espinal (Capinera, 2008).

## Figura 2

*Ala característica de Tabanomorpha, presente en la familia Tabanidae y Rhagionidae. Se denota como elemento clave en la identificación a la celda distal D y las celdas marginales P1-P5. Tomado de: (Krčmar et al., 2011).*



Los tábanos adultos (tanto machos como hembras) se alimentan de néctar y exudados de plantas, denotándose como polinizadores especializados para ciertas flores (Freeman, 2011). Las hembras requerirán de una dieta hematófaga para poder mantener una reproducción exitosa, alimentándose así principalmente de mamíferos y necesitan de aproximadamente seis días para digerir

totalmente la sangre ingerida (Croof et al., 2017). Su criterio de selección de presas suele basarse en colores contrarrestados, polarización por agua y objetos oscuros (Mugasa, Villinger, Gitau, Ndungu, Ciosi, et al., 2018). Los individuos pertenecientes a esta familia suelen evitar zonas oscuras debido a su inactividad nocturna, sin embargo, existen especies especializadas a ámbitos crepusculares y nocturnos (Mullens, 2019).

### ***Taxonomía***

La familia Tabanidae incluye cerca de 4 300 especies y subespecies en 133 géneros en todo el mundo. La familia Tabanidae se subdivide en cuatro subfamilias: Chrysopsinae, Pangoniinae, Scepsidinae y Tabaninae. Tabanidae pertenece a la superfamilia *Tabanoidea* donde junto con *Rhagionoidea*, constituye el infraorden *Tabanomorpha* entre los dípteros (Manrique-Saide et al., 2012).

Reino: Animalia

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Diptera

Suborden: Brachycera

Infraorden: Tabanomorpha

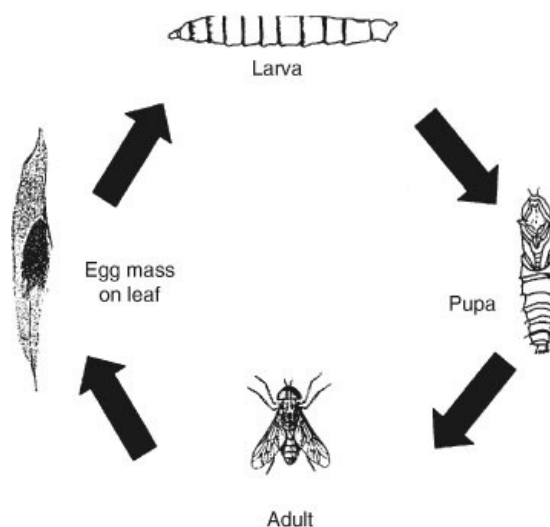
Familia: Tabanidae

### ***Ciclo de vida***

De manera general, los individuos pertenecientes a esta familia tienen una metamorfosis completa, pasando por las fases consecutivas: huevo, larva, pupa y adulto (Sarwar, 2020).

**Figura 3**

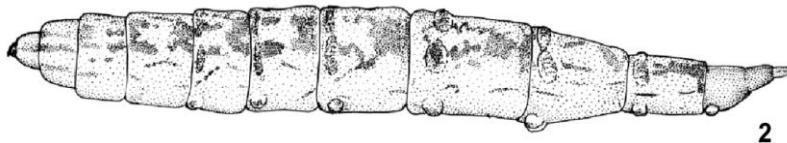
*Ciclo de vida de Chysops sp. Tomado de: (Cilek, 2008).*



Hasta la fecha, el ciclo de vida de varias especies no ha sido descrito en su totalidad (Dörge et al., 2020). Sin embargo, de manera general los huevos colocados por hembras adultas, rondando entre cifras de 100 a 1000, han sido encontrados en zonas húmedas con cercanía a agua tanto corriente como estancada (Strother, 1999). Aproximadamente en un lapso de una semana los huevos eclosionan y permanecen en el fondo de agujeros realizados en sustrato blando, cumpliendo un papel de micropredador en esta primera fase al alimentarse de materia biológica (Carvajal L., 2020).

**Figura 4**

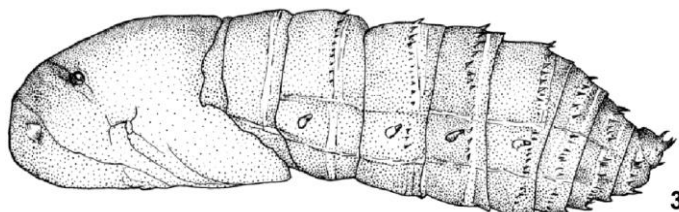
*Morfología típica de una larva de tábano. Tomado de: (Coscarón & Papavero, 2014).*



Algunas especies tienen la capacidad de hibernar en esta etapa, principalmente aquellas descritas en zonas estacionales (Dörge et al., 2020), permaneciendo en un estado de latencia hasta la llegada de la primavera (en países templados) donde pasarán a etapa pupal con una duración de aproximadamente 2-3 semanas (Sarwar, 2020). Posterior a ello pasarán a una etapa adulta con su respectivo dimorfismo sexual, donde únicamente los tabánidos femeninos serán hematófagos (Strother, 1999). Las hembras constan con una probóscide en forma de lanceta o estilete para así realizar picaduras profundas o heridas abiertas respectivamente, ingiriendo hasta 0.2 cc de sangre por cada alimentación, siendo esto un requisito fundamental para una reproducción exitosa debido a su aporte proteico indispensable en su ovogénesis, para así dar lugar nuevamente al ciclo (Sarwar, 2020).

#### **Figura 5**

*Morfología típica de una pupa de tábano. Tomado de: (Coscarón & Papavero, 2014).*



#### ***Problemáticas relacionadas a su presencia.***

Los tábanos han llegado a ser considerados un riesgo de amplio espectro, pues, tanto el sector agrícola como el social se ven afectados por la presencia de estos insectos (Baldacchino et al., 2014). Tabánidos y estolones son descritos como dípteros hematófagos de alta relevancia en la transmisión biológica y mecánica de enfermedades (Neves et al., 2018). Refiriéndose con estos términos al desarrollo y replicación de un agente patógeno transmisible dentro del individuo portador, y por su parte, al contagio de algún patógeno mediante una acción de contacto directo con el individuo receptor



respectivamente (Baldacchino et al., 2014). De este modo, su alta movilidad, dotación de grandes piezas bucales y capacidad de alimentación interrumpida vuelve a los tábanos uno de los vectores mecánicos (por picadura) más persistentes (Sevidzem et al., 2021).

El surgimiento y reaparición de múltiples enfermedades animales en los últimos años han sido atribuidos a este insecto, realizando los casos de anemia equina infecciosa (i) (Morales Briceño et al., 2015), la besnoitiosis bovina (Anastácio et al., 2022), Surra (Banerjee et al., 2015), tripanosomiasis (Zapata Salas et al., 2017), anaplasmosis (Baldacchino et al., 2014), leptospirosis, tularemia, Ántrax y Loiasis (Service, 2012). El control de estos vectores es considerado como un factor de suma importancia, y las estrategias dependerán plenamente de los géneros o incluso especies específicas de esta Familia, por lo que un control generalizado puede resultar costoso y poco práctico (Mulandane et al., 2020).

#### ***Clasificación de las especies descritas en el país***

En Ecuador, los estudios sobre esta familia se han desarrollado de manera irregular desde las primeras tres descripciones de especímenes andinos en el año 1848 (Carvajal L., 2020). Sin embargo, se ha demostrado una alta riqueza de especies, ubicando a Ecuador entre los cuatro países con mayor diversidad de especies de tábanos en el neotrópico, detrás de Brasil, Colombia y México (Cárdenas & Vieira, 2005). La tabanofauna descrita se ve mayoritariamente compartida con los países cercanos que comparten áreas biogeográficas, como Colombia (62.6%), Perú (47%), Brasil (35.9%), Panamá (35.4%) y Venezuela (30.3%), mostrando a su vez una tasa de endemismo del 12.6% (Buestán et al., 2007).

Buestán (2007) en su último repertorio cita 3 subfamilias, 5 tribus, 33 géneros y alrededor de 200 especies:

- 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).

### ***Desafíos de la taxonomía tradicional***

Un problema habitual en la clasificación morfológica de especies pertenecientes a la familia Tabanidae es que los resultados de esta se basan en caracteres que no siempre presentan información útil al ser aplicada en otros grupos de dípteros (Lessard et al., 2013). Un ejemplo de ello es el análisis de genitales en tábanos machos, pues al no corresponder a la morfología externa del mismo puede conllevar a la imprecisión en su caracterización al punto de no discriminar entre especies. Por otra parte, algunos rasgos variarán según el estado de la muestra, tal como la variación de la longitud de la probóscide o el cambio y pérdida de colores en el individuo según el tiempo transcurrido desde su muerte (Mackerras et al., 2008).

Las bases taxonómicas dadas en Suramérica se encuentran particularmente fragmentadas debido a una serie de cambios en los términos taxonómicos entre estudios realizados (Lessard et al., 2013). Algunos géneros se encuentran descritos de manera incompleta e inadecuada, llegando a casos en los que se llegue a confusiones debido a errores o al poco entendimiento en la taxonomía y relaciones sistemáticas realizadas en el pasado (Buestán, 1980; Buestán et al., 2007; Cárdenas & Vieira, 2005).

### ***PCR Barcoding***

Tal como las especies muestran diferencias en su morfología y ecología, lo muestran en su ADN (Ashfaq et al., 2022). El “DNA barcoding” como una herramienta taxonómica se ha establecido ante la necesidad de una alternativa útil y fiable en comparación a la taxonomía tradicional, de modo que a

partir de un fragmento de ADN extraído, amplificado y secuenciado se puede discernir a especies de otras entre un grupo de muestras (Krčmar et al., 2011, 2022).

El principio de esta técnica se basa en que cada organismo vivo mantiene similitudes suficientes dentro de una misma especie, de manera que un fragmento de ADN determinado sirve como código de barras para la identificación de cualquier miembro perteneciente a esta, proponiéndose así como una metodología rápida y precisa de taxones (Banerjee et al., 2015). Un locus específico permitiría establecerse como secuencia para barcode si este se mantiene lo suficientemente conservado dentro de una misma especie, pero con las variaciones suficientes con otras como para distinguirlas, de este modo, existen barcodes para los diversos niveles taxonómicos, siendo los más comunes: familia, género y especie (Moritz & Cicero, 2004).

Para la utilización de esta técnica es fundamental la existencia de una norma de identificación para el grupo taxonómico a estudiar, basándose normalmente en los principios taxonómicos de Linnaeus, evitando así perder el seguimiento a las hipótesis de clasificación de especies (Frézal & Leblois, 2008).

Esta técnica nace a partir del uso de cebadores para el gen COI (citocromo c oxidasa I) con fragmentos de 648 pares de bases y secuenciación de los amplicones conseguidos, denotando la alta funcionalidad de estas secuencias para la diferenciación de especies debido a que la variabilidad genética del gen entre distintas especies es mucho mayor a la existente dentro de una misma (Austerlitz et al., 2009).

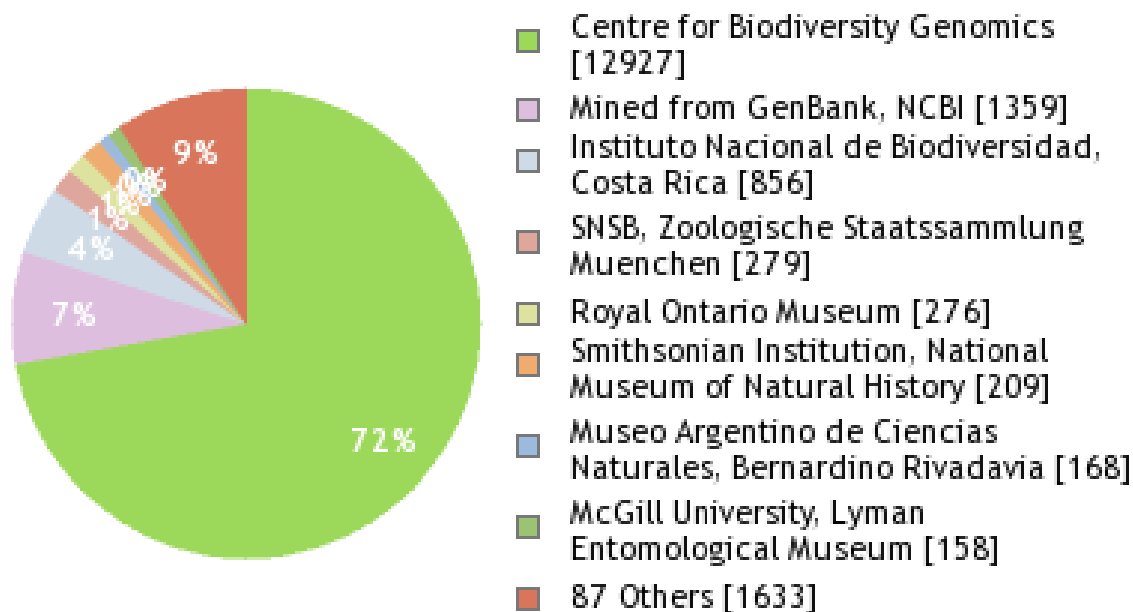
A pesar de todas sus ventajas, se mantienen ciertas limitaciones, tal como la necesidad de una biblioteca de barcodes de referencia con especies previamente identificadas, estrechando su metodología a las previamente existentes (Banerjee et al., 2015). Sin embargo, su uso abarca también

campos como la ecología al permitir comprobar y dar seguimiento a los procesos evolutivos de un grupo de muestras (Moritz & Cicero, 2004) .

El uso y popularidad de esta técnica permitió el desarrollo del CBOL (Consortio para el Código de Barras de la Vida), centrado en desarrollar DNA barcodes estandarizados para la distinción de especies. Hoy en día, existen aproximadamente 280 mil especies caracterizadas en BOLD (The Barcode of Life Data) de las cuales únicamente 631 corresponden a especies de tábanos con sus barcodes, correspondiendo la gran mayoría a especímenes recolectados en Canadá y Costa Rica (*BOLD Systems: Taxonomy Browser - Tabanidae {family}*).

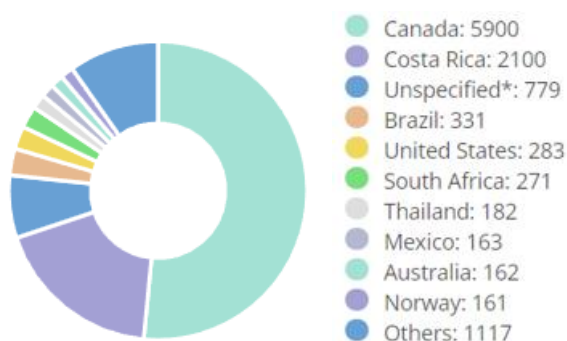
#### Figura 6

Bancos de especímenes de tábanos. Tomado de: (*BOLD Systems: Taxonomy Browser—Tabanidae*)



**Figura 7**

*Aporte de los países a la secuenciación de tábanos. Tomado de: (BOLD Systems: Taxonomy Browser—  
Tabanidae)*

***Citocromo c oxidasa I (COI) como marcador molecular***

El gen COI se ha mostrado presente en todo el desarrollo del DNA barcoding, dando origen al mismo mediante la caracterización de un fragmento de este, pues el número de mutaciones para este locus se mostró en incremento a medida que pasa el tiempo de coalescencia (Oliveira et al., 2023). Entre los dípteros, el gen COI ha mostrado una divergencia de secuencias de hasta el 9%, sin embargo, este valor varía significativamente según su región geográfica por lo que se suele requerir un análisis previo (Colihueque et al., 2021). Cywinska et al. (2010) evaluó este método para identificar 4 especies de tábanos (*T. atratus*, *T. marginalis*, *T. rufrofrater*, *T. similis*) y denotó un ratio de divergencia del 5.96% entre colecciones canadienses. De manera similar, Bajeree et al. (2015) en India utilizaron este gen para identificar *T. striatus* y caracterizarlo como el vector causante de la Surra en el ganado.

Por su parte, ha sido utilizado en países del Neotrópico, tal como en Chile, caracterizando así nuevos ejemplares y generando sus propias bases de datos sobre la biodiversidad de estos insectos en la región (González, 2009)

De este modo, el gen COI aparenta mostrarse como un marcador molecular útil para la identificación taxonómica de tábanos (Davis, 2019; Krčmar et al., 2022), requiriéndose una construcción de bases de datos para COI barcodes en la región.

### Capítulo III

#### Materiales y Métodos

##### *Colecta de muestras*

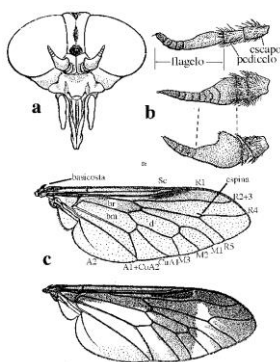
Se recolectó un total de 60 muestras mediante el uso de trampas caseras para tábanos y trampas NZI en las provincias de Pichincha, Orellana, Manabí, Napo, Sto. Domingo de los Tsáchilas, Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura. Las moscas recolectadas fueron almacenadas en etanol 95%.

##### *Determinación de la familia Tabanidae a partir de características morfológicas de la muestra.*

Mediante el empleo de un estereomicroscopio se visualizó cada una de las muestras conservadas previamente en etanol 95%, distinguiendo los caracteres claves descritos por Lessard et al. (2013), basándose en el esquema de la Figura 8.

#### Figura 8

*Características morfológicas para distinción de especies pertenecientes a la familia Tabanidae. Tomado de: (Burger, 2023)*



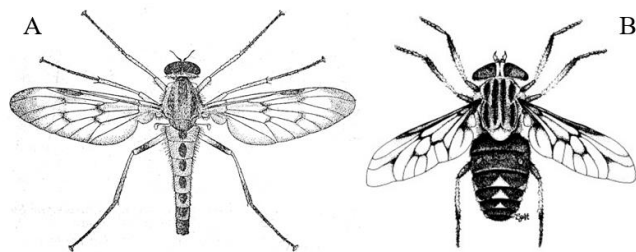
De este modo, los criterios morfológicos clave para una clasificación a nivel de familia quedaron definidos de la siguiente manera:

- Ojos compuestos prominentes.
- Antenas cortas compuestas compuestas de tres segmentos
- Cuerpo aplanado
- Ala característica de Tabanomorpha, con celda distal y cinco celdas marginales (Figura 2 y 8).

Se debe tomar en cuenta que los miembros pertenecientes a la familia Rhagionidae comparten gran parte de sus características, diferenciándose principalmente por su abdomen cilíndrico.

#### Figura 9

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



#### ***Estandarización de un protocolo manual de extracción de ADN***

Inicialmente, se dejó secar a todas las muestras conservadas en etanol a temperatura ambiente sobre papel absorbente por 15 minutos, permitiendo manipular así a la muestra con solidez.

Para la implementación de este protocolo se definió como variables al buffer de lisis y al reactivo de separación de fases, definiéndose las composiciones detalladas en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Variables definidas para la estandarización del protocolo de extracción de ADN.*

<b>Variable</b>	<b>Opción</b>	<b>Composición</b>
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	Clf/Alc.Iso.	Proporción Cloroformo/Alc. Isoamílico 24:1
	NaCl	NaCl 5M llevado a 1.1M en el volumen final

*Nota.* Esta tabla concreta los parámetros variados en el proceso de extracción

### ***Protocolo definido.***

Se propuso una modificación al trabajo comparativo de Gutiérrez-López et al., (2015), quienes comprueban la eficacia de métodos manuales de extracción y semi automáticos para protocolos de barcoding de moscas hematófagas de la familia Hippoboscidae, definiendo alternativas en los pasos críticos del proceso de extracción manual.

En tubos de 1.5 mL se colocó 850 µL del respectivo buffer de Lisis, siendo este un volumen suficiente para cubrir a cualquier mosca de la familia Tabanidae a utilizar, con ello se procedió a la molienda de la mosca previamente secada mediante la utilización de un pistilo y a esto se le añadió 3.4 µL de proteinasa K a una concentración de 30 mg/mL para llevarlo a incubación por 3 horas a 55 °C. Una vez pasado este tiempo se añadió 6 µL de RNAsa y se llevó a incubar por 30 minutos a 37 °C. Para la separación del ADN de esta mezcla se procedió a añadir 300 µL del agente de separación de fases respectivo y se permitió una incubación a temperatura ambiente por 10 minutos con la finalidad de precipitar las proteínas no digeridas.



Se prosiguió con una centrifugación por 5 minutos a 16 000 gravedades y se retiró el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL, donde se pasó a colocar un volumen de etanol absoluto similar al de sobrenadante extraído. Luego se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, a una centrifugación de 13 400 gravedades por 15 minutos y se realizó dos lavados con 500  $\mu$ L de etanol frío al 70% con centrifugaciones a 13 400 gravedades por 5 minutos. Se dejó secar los pellets de DNA sobre papel filtro por al menos 30 minutos para asegurar la evaporación del etanol y a continuación se rehidrató las muestras con 50  $\mu$ L de agua ultrapura para su conservación a -20 °C. El ADN extraído se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh y 2  $\mu$ L de cada muestra. Se midieron los ratios de pureza 260/280 nm y 260/230 nm, determinando el margen de 1.8 a 2.2 como ADN de buena calidad (Leonel et al., 2020).

Para corroborar la presencia de ADN de las muestras tratadas se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/v) teñidos con Sybr-Safe. Por pocillo se cargó 3  $\mu$ L de cada muestra con el buffer de carga Blue Dextran 2x o Blue Juice 2x y un pocillo con 1.6  $\mu$ L de marcador de peso molecular de 100 bp. Las condiciones de corrido se establecieron en 120 V por 1 hora y al finalizar este proceso se visualizó el gel usando un transiluminador con luz UV.

La tabla 2 muestra variaciones en los volúmenes definidos en función del tipo de muestra con la que se trabajó.

**Tabla 2**

*Volúmenes de reactivos fijados para el trabajo con distinto material de muestra.*

<b>Reactivo</b>	<b>Mosca completa</b>	<b>Cabeza</b>	<b>2 Patas</b>
Buffer de lisis	850 µL	300 µL	200 µL
Etanol absoluto	600 µL	250 µL	150 µL
Etanol 70% (lavados)	500 µL	200 µL	200 µL

*Nota.* Los volúmenes de enzimas utilizadas y los tiempos de incubación en cada paso se mantuvieron constantes

### ***Análisis estadístico***

Los promedios y desviaciones estándar fueron calculados a partir de los resultados de la cuantificación de ADN de las muestras trabajadas con las variaciones aplicadas en el protocolo de extracción de ADN. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) usando la prueba F y los grupos se compararon mediante una prueba de Tukey, fijando intervalos de confianza de 95% y un valor de  $p \leq 0,05$  para demostrar significancia en los tratamientos aplicados y demostrar cual de estos fue significativamente mayor. Estos análisis se realizaron mediante el uso del software Infostat.

### ***Optimización de una reacción de PCR para el marcador molecular COI.***

Una vez obtenido y haber sido corroborada la presencia de ADN del insecto, se realizó ensayos variando los parámetros descritos en la tabla 3.

**Tabla 3***Variables definidas para la PCR*

Parámetro	Variaciones
Temperatura de hibridación de los cebadores	49°C
	50°C
	51°C
	52°C
Cantidad de MgSO <sub>4</sub>	1.5 mM
	2 mM
	2.5 mM
	3 mM
Cantidad de DNA	25 ng/μL
	20 ng/μL
	15 ng/μL

*Nota.* Estos parámetros se definieron con el fin de establecer una sensibilidad y especificidad óptima en la reacción.

Basándose en la amplificación del gen citocromo c oxidasa I (COI) en el trabajo de Lessard et al., (2013) con los cebadores TY-J-1460 (mtd4) y C1-N-2329, se fijaron los valores de los demás reactivos para la PCR descritas en la tabla 4, y las condiciones de reacción descritos en la tabla 5.

**Tabla 4***Concentraciones de reactivos utilizadas en la mastermix para la PCR*

TAQ PRESIÓN (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

*Nota.* Los valores para variar en la concentración de iones magnesio deben tomar en cuenta el existente en el buffer, 7.5 mM en este caso.

**Tabla 5***Condiciones de reacción de la 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	-	-

*Nota.* La temperatura de hibridación se establece como variable crítica.

**Tabla 6**

*Cebadores utilizados para la amplificación del gen COI en tábanos.*

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

*Nota.* Recuperado de: (Lessard et al., 2013).

Una vez conseguidos los productos de PCR, estos fueron cargados en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) teñido con SybrSafe con el buffer de carga BlueJuice 2x en condiciones de 100 V por una hora. Se comprobó la presencia de bandas de amplicón mediante el uso del transiluminador con luz UV.

#### ***Análisis filogenético.***

Para los análisis del porcentaje de identidad entre secuencias se utilizó el programa Geneious Prime. Las secuencias del gen fueron corregidas y posteriormente alineadas mediante la herramienta MUSCLE del software MEGA11. Para la elaboración del árbol filogenético se empleó el método Neighbor-Joining con un bootstrapping de 1000 réplicas, aplicando el modelo Tamura-Nei para la medición de la distancia genética en el mismo software.

Este proceso se desarrolló con secuencias obtenidas en BOLD Systems. Con la finalidad de corroborar las secuencias obtenidas a partir de la amplificación del gen COI de tábanos se procedió a utilizar la plataforma BLASTn del NCBI.

## Capítulo IV

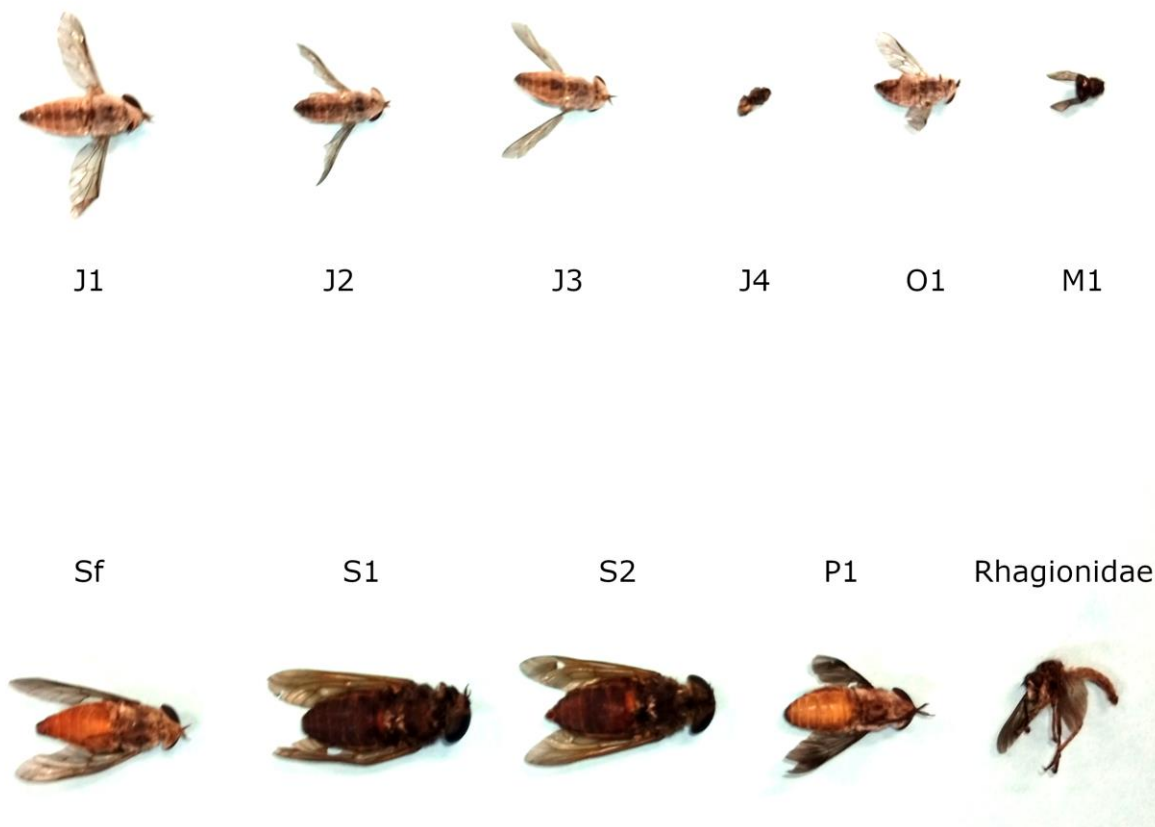
### Resultados

#### *Determinación de las muestras a utilizar*

De un total de 60 moscas recolectadas se determinó que 10 muestras pertenecen a la familia Tabanidae mediante las características morfológicas descritas en la Figura 8, y se denotó que no pertenezcan a la familia Rhagionidae mediante la clave de la Figura 9.

#### **Figura 10**

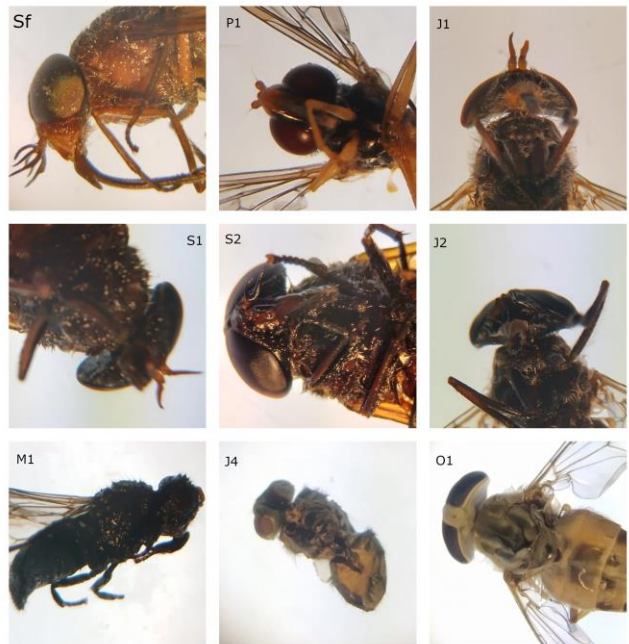
*Tábanos encontrados entre las muestras almacenadas y un ejemplar de la familia Rhagionidae como grupo excluyente entre tabanomorfos.*



Además, se determinó que todas las muestras excepto J3 son de sexo femenino debido a la separación de sus ojos, característica típica de las hembras de esta familia.

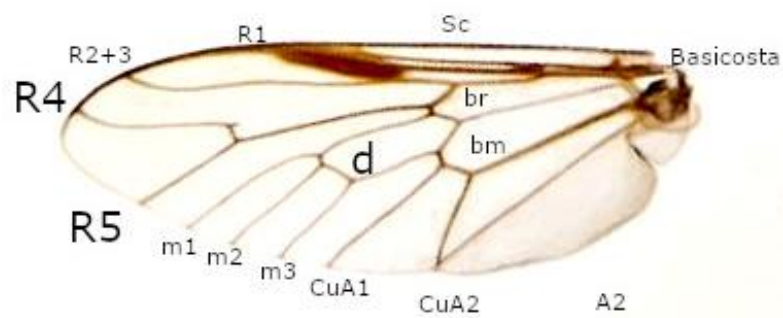
**Figura 11**

*Determinación de sexo de los tábanos mediante la morfología de la cabeza*



**Figura 12**

*Estructura del ala de todas las muestras seleccionadas.*

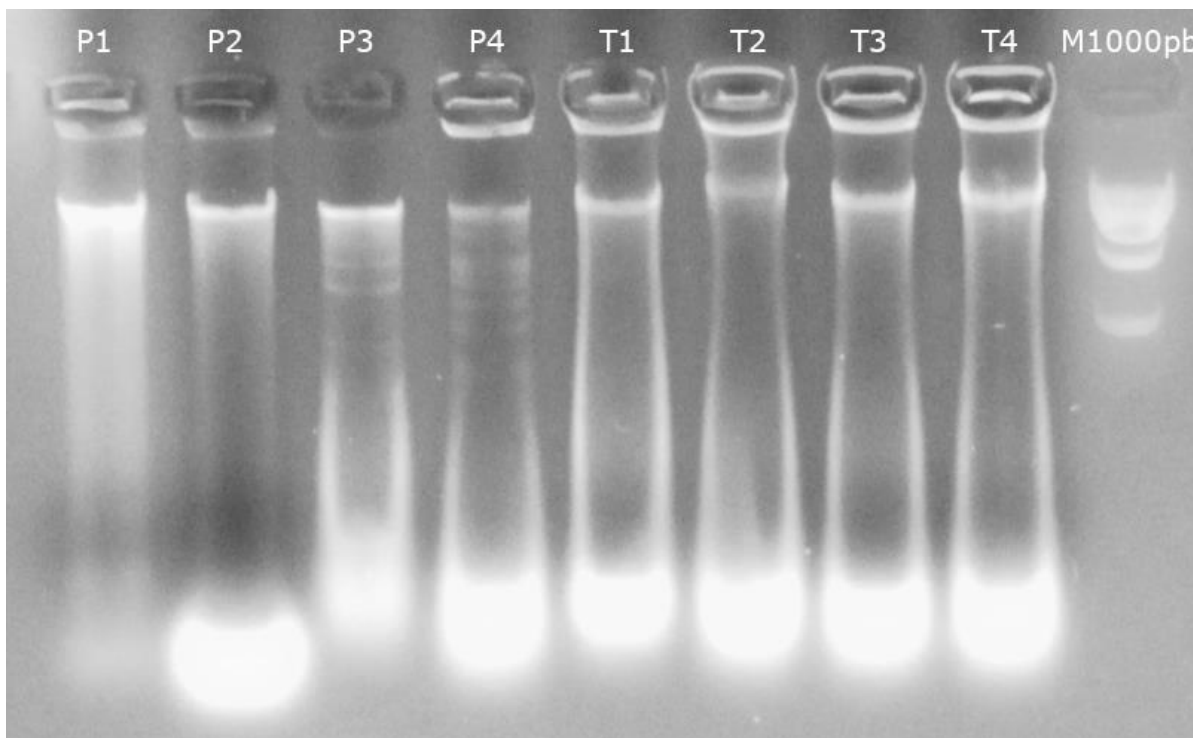


### ***Estandarización del protocolo de ADN.***

Para validar la eficacia de los protocolos de extracción de ADN se utilizaron ejemplares de *Musca domestica* (mosca doméstica) descartadas en el proceso de selección de tábanos debido a la poca cantidad de las muestras de interés. En un primer intento con el protocolo de Gutiérrez-López et al., (2015) se denotó una alta presencia de ARN (Figura 13), para lo cual se adicionó 6  $\mu$ L de RNAsa y una incubación a 37°C por 30 minutos.

### **Figura 13**

*ADN extraído mediante la aplicación del buffer de lisis 1 y el tratamiento P (Alcohol isoamílico/cloroformo 1:24) y T (NaCl 1.1M).*

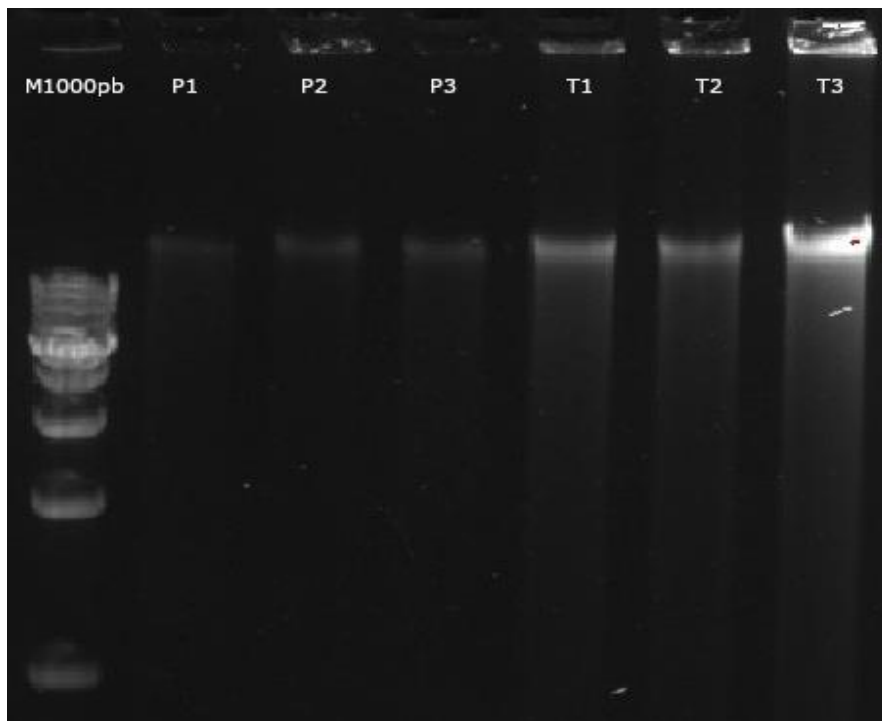


Se varió la cantidad del buffer de lisis para determinar diferencias en la molienda de la mosca y la cantidad final de ADN obtenido (Figura 14).



**Figura 14**

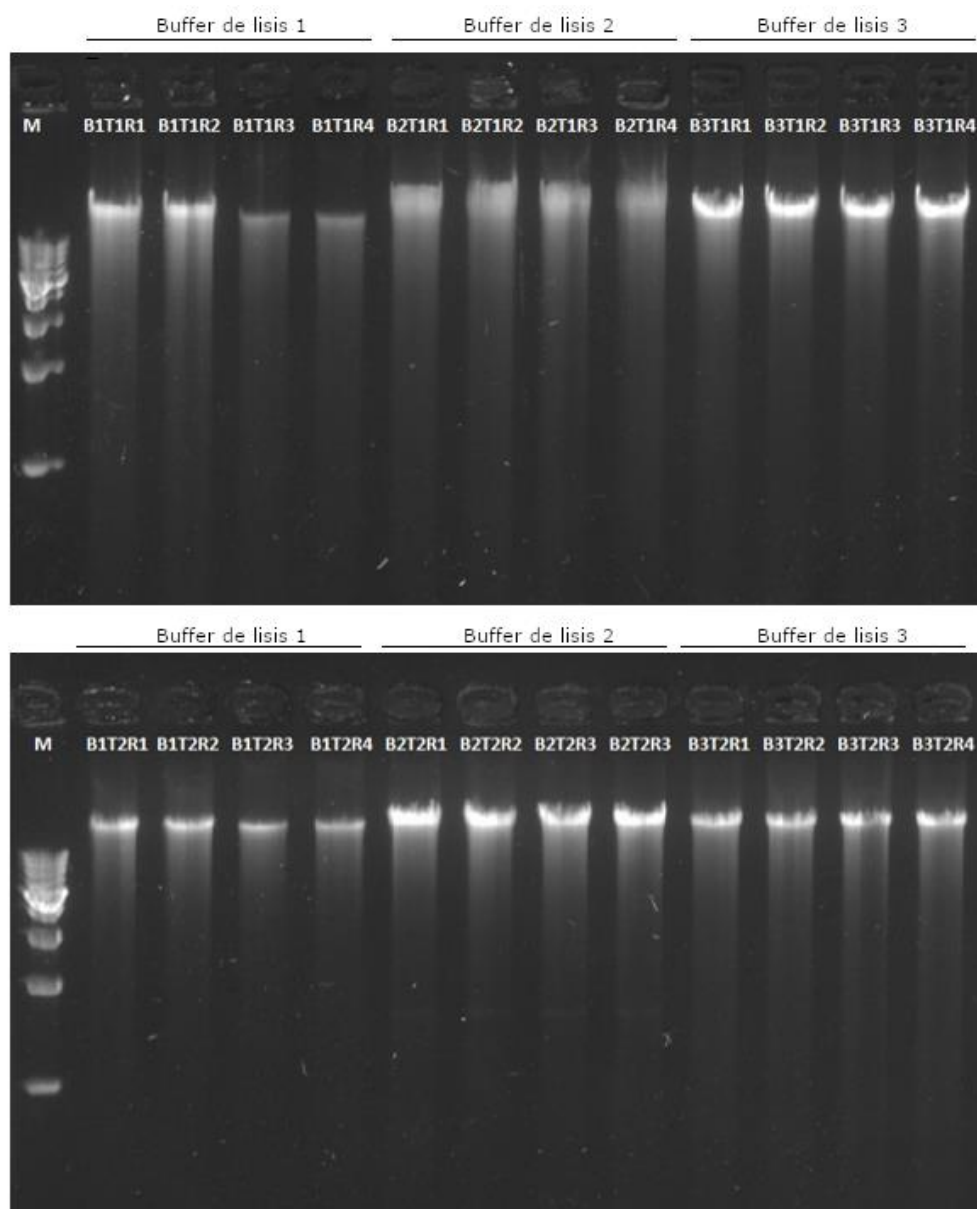
*ADN extraído mediante la aplicación del buffer de lisis 1 y el tratamiento P (Alcohol isoamílico/cloroformo 1:24) y T (NaCl 1.1M) posterior a la aplicación de RNAsa.*

***Análisis de los protocolos de extracción de ADN planteados.***

Se evaluó la calidad y cantidad de ADN extraído mediante un gel de agarosa al 0,8% preparado con TBE 1X; de forma adicional se comprobó las purezas (A260/A280) y (A260/A230) al cuantificar las extracciones. En todas las muestras se denotaron bandas de mayor tamaño a los 1000 bp, siendo aquellas separadas con cloroformo/alcohol isoamílico (T2) aquellas que menos arrastre presentaron (Figura 15).

**Figura 15**

*ADN extraído mediante la aplicación de cada protocolo de extracción propuesto*



*Nota:* B1: Buffer de lisis 1, B2: Buffer de lisis 2, B3: Buffer de lisis 3; T1: Alcohol isoamílico/cloroformo 1:24, T2: NaCl 1.1 M y R correspondiente a cada repetición.

Tabla 7

Concentraciones, pureza (A260/A280) y (A260/A230) para cada tratamiento aplicado.

Buffer de Lisis	Agente de separación	Repetición	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)	Concentración ng/ $\mu$ L
B1	P1	R1	1.739	0.9126	288.6
		R2	1.763	1.078	337.6
		R3	2.01	1.081	148.1
		R4	1.971	1.098	166.9
	P2	R1	1.958	1.486	182.9
		R2	1.896	1.434	299.5
		R3	2.02	1.478	227.8
		R4	2.023	1,581	204.2
B2	P1	R1	1.834	0.8994	323.1
		R2	1.821	0.9019	298.4
		R3	1.853	0.9714	277.8
		R4	1.88	0.9206	362.2
	P2	R1	1.975	1.362	635.9
		R2	1.969	1.369	570.1
		R3	1.96	1.367	606.8
		R4	2.012	1.383	606.6
B3	P1	R1	2.028	1.487	584.7
		R2	2.076	1.636	819.4
		R3	1.992	1.447	673.9
		R4	2.091	1.684	846.7
	P2	R1	1.935	1.217	300
		R2	1.968	1.236	653.7
		R3	1.915	1.19	305.6
		R4	1.905	1.14	315.8

*Nota.* La cuantificación comprobó que (A260/A230) se mantuvo fuera del rango óptimo de 2.0 a 2.2 en todos los tratamientos.

Con los datos conseguidos se comprobó que se cumple con los supuestos de normalidad mediante un diagrama Q-Q plot (Figura 16) y una prueba de Shapiro-Wilks (Tabla 8) con los residuos

obtenidos a partir de las concentraciones, su homogeneidad e independencia mediante un diagrama de dispersión (Figura 17) donde no se encontró un patrón en el mismo.

### Figura 16

Diagrama Q-Q plot de los residuos obtenidos a partir de las concentraciones medidas, se denota normalidad en la dispersión de datos.

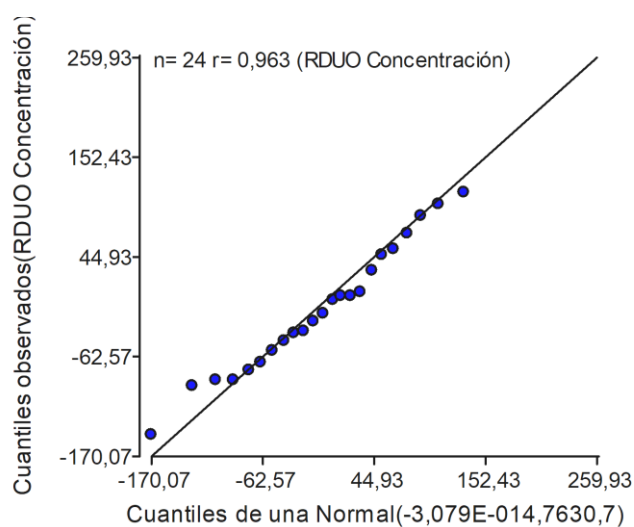


Tabla 8

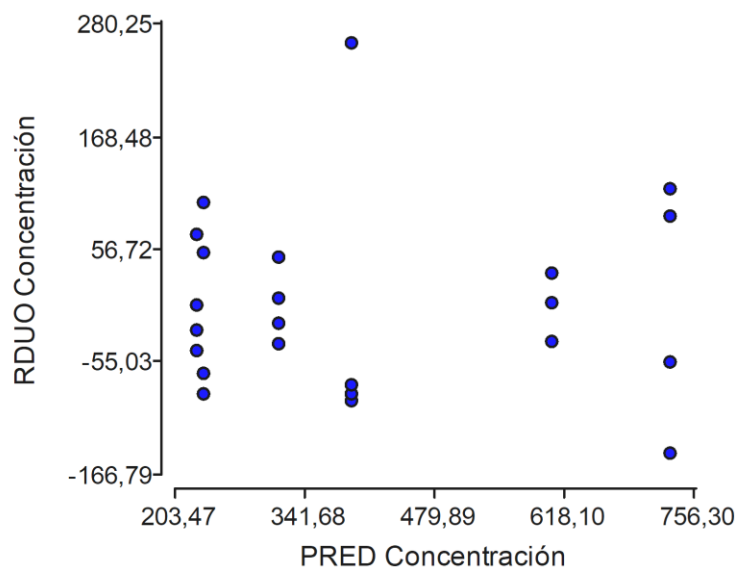
Prueba de Shapiro-Wilks con los errores obtenidos de las concentraciones.

Variable	n	Media	D.E.	W*	P (Unilateral D)
RDUO Concentración	24	0.00	87.35	0.95	0.5053

Nota. El p-valor de la prueba es mayor al nivel de significancia 0.05, por lo que existe normalidad en los datos del diseño experimental

**Figura 17**

Diagrama de dispersión de los PRED vs RDUO de las concentraciones.



Se demostró una interacción significativa entre los tratamientos de buffer de lisis y el agente de separación de fases ( $F=23.49$ ;  $p\text{-value}<0.0001$ ) (Tabla 9). Además, se mostró una significancia individual en la dependencia de la concentración en función del buffer de lisis empleado ( $F=20.17$ ;  $p\text{-value}<0.0001$ ) (Tabla 9).

Se denotó que los buffers de lisis más efectivos fueron los Buffer 2 y 3, con medias de  $460.11\pm 34.91$  y  $562.48\pm 34.91$  ng/ $\mu\text{L}$  respectivamente (Tabla 10). Por su parte, la interacción más representativa fue el Buffer 3 con el alcohol isoamílico/cloroformo 24:1 con una media de  $731.18\pm 49.37$  ng/ $\mu\text{L}$  (Tabla 11).

**Tabla 9***ANOVA (SC tipo I) basado en las concentraciones de ADN*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
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		

*Nota.* El p-valor del Buffer de lisis y de la Interacción entre los dos tratamientos fueron significativos.

Se realizó tests de Tukey para cada tratamiento significativo (Tabla 10 y 11) para observar aquellos con mayores rendimientos.

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

<b>Buffer de Lisis</b>	<b>Medias</b>	
B1	231.95	A
B2	460.11	B
B3	562.48	B

*Nota.* B2 y B3 fueron significativamente superiores a B1.

**Tabla 11**

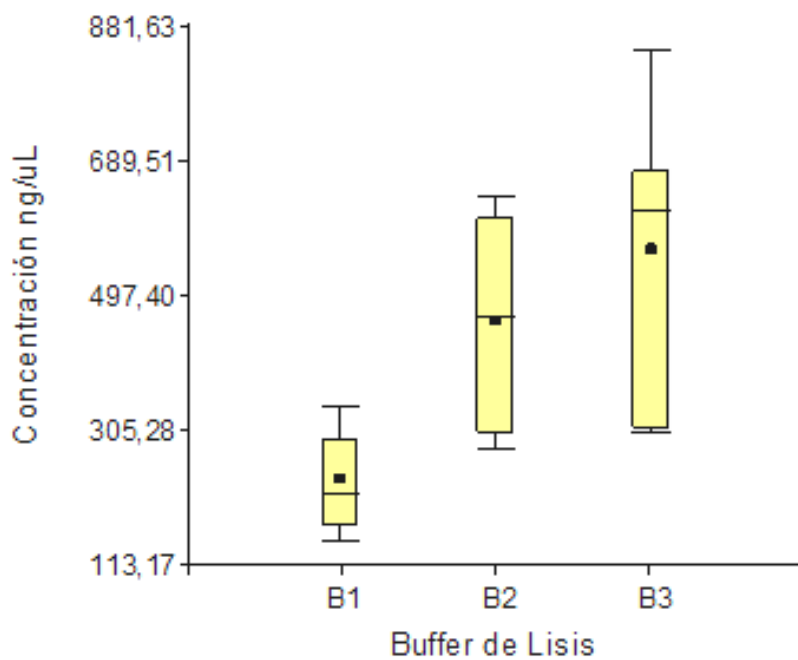
*Test de Tukey; Alfa=0.05 para la interacción entre el Buffer de lisis y el Agente de separación de fases*

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

*Nota.* El p-valor de la interacción entre B3 y P1 mostró una mayor eficacia significativa.

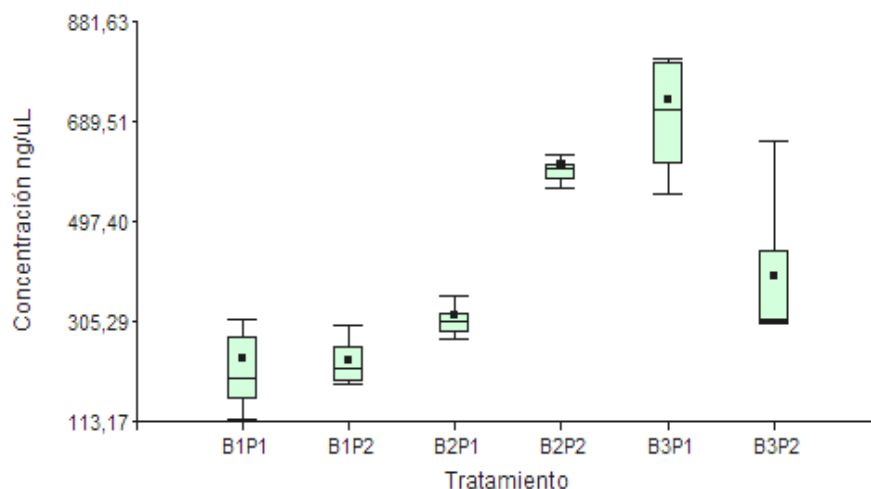
**Figura 18**

*Diagrama de Caja y Bigotes de la concentración de ADN en función del buffer de lisis empleado*



**Figura 19**

Diagrama de Caja y Bigotes de la concentración de ADN en función del tratamiento empleado



### Extracción de ADN de los tábanos selectos

Se aplicó el protocolo definido con el uso del buffer de lisis 3 y cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, obteniendo la cuantificación descrita en la Tabla 12 y se observó una integridad aceptable de las muestras (Figura 20).

**Tabla 12**

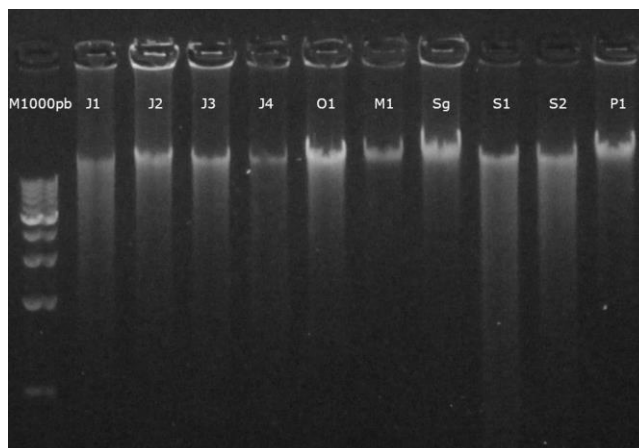
Cuantificación de ADN de las muestras de tábano.

Muestra	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)	Concentraciones de DNA (ng/μL)
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



**Figura 20**

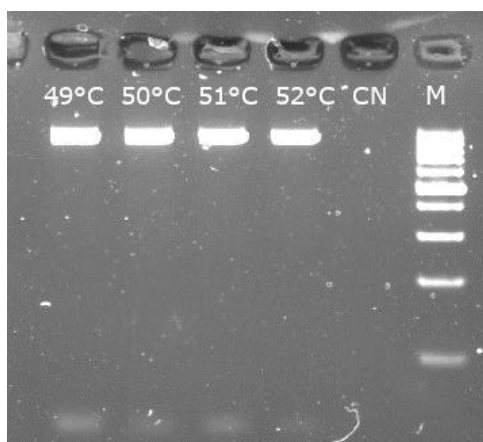
*Electroforesis de 200ng/ $\mu$ L de las muestras de ADN extraídas.*

***Optimización del protocolo de PCR***

Se consiguió amplicones en todas las variaciones de un gradiente de temperatura de 49°C a 52°C, sin embargo, a menor temperatura se denotó una mayor cantidad de dímeros (Figura 21). Se optó por mantenerse la temperatura teórica de 51°C para los siguientes ensayos.

**Figura 21**

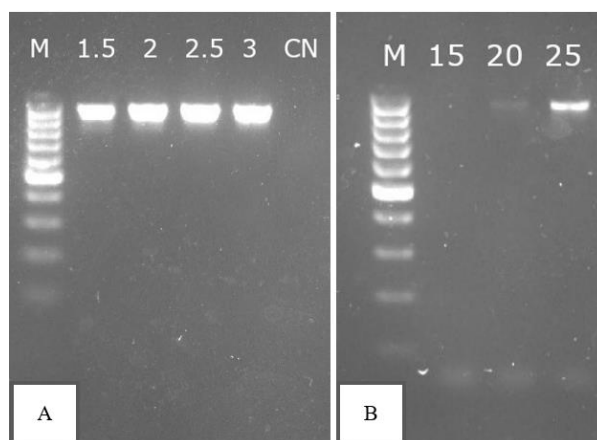
*Amplicones del gen COI con la aplicación de un gradiente de temperatura.*



En la variación de concentración de sulfato de magnesio, se consiguieron amplicones en todas las cantidades, denotándose un menor arrastre en el corrido de la banda con 2.5 mM y 3 mM (Figura 22.A). Se detectó la concentración mínima de ADN necesaria mediante un gradiente, denotándose una banda leve a 20 mM pero con visualización óptima del amplicón a 25 mM (Figura 22.B).

### Figura 22

*Amplicones del gen COI con (A) la aplicación de un gradiente de magnesio y (B) un gradiente de concentración de ADN*

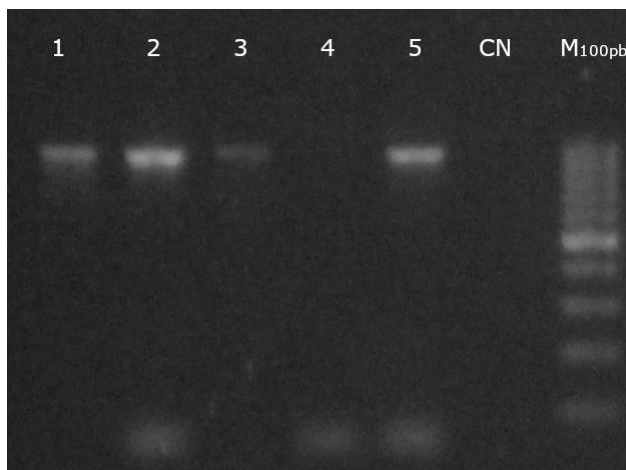


### PCR con las muestras de ADN extraído

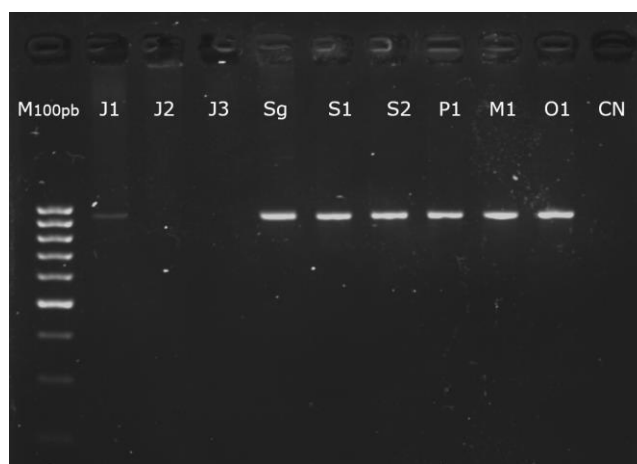
Se utilizó 2  $\mu\text{L}$  del ADN extraído de las muestras de *Musca domestica* seleccionadas a una concentración de 12.5 ng/ $\mu\text{L}$ , definiendo una mezcla para reacción completa (25  $\mu\text{L}$ ) con una concentración de sulfato de magnesio de 2.5 mM. En la Figura 23 se muestran las bandas conseguidas en un gel de agarosa al 1.5% preparado con TBE 1X, corrido en electroforesis con buffer TBE 1X por una hora a 100V. Por su parte, la Figura 24 muestra los resultados de la PCR obtenidos a partir de las muestras de tábanos.

**Figura 23**

*Amplificación del gen COI en cinco muestras de Musca domestica.*

**Figura 24**

*Amplificación del gen COI en las muestras de tábanos seleccionadas.*



#### ***Determinación de la eficiencia de los protocolos trabajados***

La extracción de ADN tuvo una eficiencia del 100% con todas las muestras utilizadas, tanto de *musca domestica* como de los tábanos utilizados. Se consiguió una eficiencia de 80% en la amplificación del gen COI para las muestras de *Musca domestica* y del 77.77% para las muestras de tábano (Tabla 13).

**Tabla 13**

*Eficiencia de los protocolos fijados sobre las muestras trabajadas según el protocolo de extracción de ADN y de PCR.*

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

#### ***Secuencias seleccionadas para análisis filogenético***

Se utilizaron 60 secuencias consenso del gen COI disponibles en la base de datos BOLD Systems, siendo 59 de estas especies a tábanos de diversos géneros y una secuencia control correspondiente a *Musca doméstica*. Se registró el código BIN de cada secuencia tomada.

**Tabla 14**

*Especies utilizadas en el análisis filogenético, recuperadas de BOLD Systems*

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 thoracicus</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 parallelogrammus</i>	CROTA003-20	<i>Tabanus pungens</i>	ASIND4155-12
<i>Chrysops shermani</i>	BBDEC417-09	<i>Tabanus rupium</i>	CROTA017-20

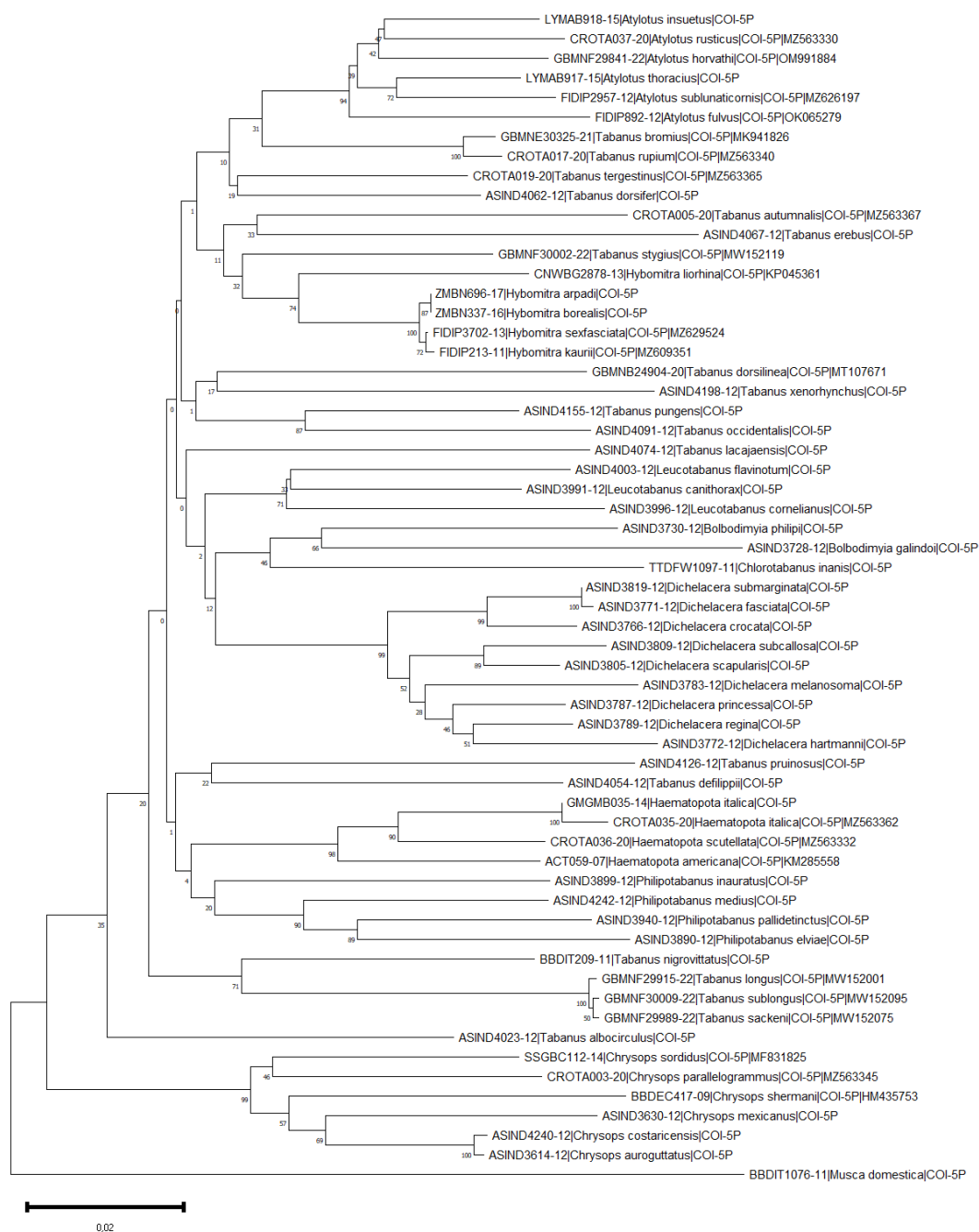
ESPECIE	BIN	ESPECIE	BIN
<i>Chrysops sordidus</i>	SSGBC112-14	<i>Tabanus sackeni</i>	GBMNF29989-22
<i>Dichelacera crocata</i>	ASIND3766-12	<i>Tabanus stygius</i>	GBMNF30002-22
<i>Dichelacera fasciata</i>	ASIND3771-12	<i>Tabanus sublongus</i>	GBMNF30009-22
<i>Dichelacera hartmanni</i>	ASIND3772-12	<i>Tabanus 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

### **Desarrollo del árbol filogenético**

El análisis de estas secuencias mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) comprobó que estas pertenecieran al organismo descrito. Con ello, se armó el árbol filogenético mediante el método Neighbor-Joining Tree en la herramienta MEGA11, empleando fragmentos del gen COI de hasta 659 pb alineados por el mismo software, agrupando individuos pertenecientes al mismo género de la familia Tabanidae. La barra de escala representa una divergencia del 0.02% en el árbol representado en la Figura 25.

Figura 25

Árbol filogenético de individuos de la familia Tabanidae, realizado por el método Neighbor-Joining establecido con 1000 bootstraps y el modelo de Tamura-Nei.



## Capítulo V

### Discusión

El estudio de fauna silvestre mediante técnicas moleculares y morfológicas se ha vuelto estrictamente necesaria para el control de enfermedades de interés zootécnico (Liu et al., 2022; Mugasa, Villinger, Gitau, Ndungu, Marc Ciosi, et al., 2018; Najera-Cortazar et al., 2023). Mediante un análisis morfológico se determinó y corroboró un total de 10 muestras de tábanos en la colección de 60 dípteros disponibles. El uso del patrón de nervaduras de las alas en la determinación morfológica radica únicamente en miembros del infraorden Tabanomorpha de Brachycera, englobando a las familias Tabanidae y Rhagionidae (Krčmar et al., 2011). Para discriminar a los individuos de esta última familia se tomó en consideración la forma aplanada y ovoide del abdomen, correspondiendo esta característica únicamente a Tabanidae (Changbunjong et al., 2021). La conservación de las muestras fue realizada en etanol (95-100%), sin embargo, este método ha sido descrito poco óptimo para preservar la integridad física de los insectos (Marquina et al., 2021).. El almacenaje en etanol 70% conlleva por su parte a una menor calidad en ADN extraído (Marquina et al., 2021). La edad muestral máxima sugerida para realizar un barcoding en artrópodos es de 8 años debido a que los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) han demostrado mayor rendimiento en amplificaciones de muestras que entren en este rango (Carew et al., 2017). Por su parte, el número de copias del amplicón del gen COI ha mostrado reducirse proporcionalmente en función de la disminución de la concentración de etanol en el medio de conservación (Marquina et al., 2021).

Los resultados obtenidos a partir de la extracción de ADN muestran valores de pureza y concentraciones dentro de los rangos aceptables para preparación de librerías (Anahtar et al., 2016). Sin embargo, los valores de absorbancia A260/A230 indican posible contaminación química, relacionada a la

presencia de carbohidratos, EDTA residual y sales presentes, lo cual puede mejorarse aumentando el tiempo de precipitación de ADN en etanol (Jangra & Ghosh, 2022).

Los métodos de extracción manuales trabajados proponen un balance iónico relacionado a las concentraciones de NaCl dadas, un quelado de iones de magnesio utilizados por nucleasas causado por la presencia de EDTA y un pH de trabajo a lo largo del proceso circundante a 8 (Chanu et al., 2021). Se demostró una interacción significativa entre el buffer de lisis y el agente de separación de fases empleado sobre la concentración de ADN extraído, además de una significancia individual en función del buffer de lisis empleado. El mejor tratamiento corresponde a la interacción entre el buffer de lisis 3 y el cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, ya que la mayor concentración de NaCl (400 mM) conlleva a una mayor solubilidad de polisacáridos en el etanol, de modo que se inhiba la co-precipitación de estos con el ADN (Abdel-Latif & Osman, 2017).

Por su parte, el uso de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 como agente separador de fases facilita la remoción de proteínas residuales y la reducción en formación de espuma causada por el buffer de lisis (Chanu et al., 2021). La degradación observable en las bandas de material genómico se puede atribuir al tiempo de almacenaje de las muestras (de hasta 3 años) a temperatura ambiente, siendo un entorno de -20 o -80°C lo más recomendable (Post et al., 1993).

La amplificación de la unidad  $\alpha$  del gen citocromo C oxidasa I en muestras de tábanos del país se ha descrito con secuencias que oscilan entre los 670 y 689 pb (Jumbo, 2021), sin embargo, los cebadores utilizados en este trabajo permitieron la amplificación de fragmentos que rondan los 824 pb, de manera similar a los resultados descritos por (Lessard et al., 2013)), quien propuso un método de análisis filogenético a gran escala para tábanos de la tribu Scionini.



La variación de la temperatura de hibridación no mostró diferencias considerables en la amplificación del gen COI en un rango de 49 a 52°C, coincidiendo con otros protocolos (Banerjee et al., 2015; Cywinska et al., 2010; Krčmar et al., 2022; Oliveira et al., 2023).

El uso de sulfato de magnesio a una concentración final de 1.5 mM fue suficiente para amplificar este fragmento; se fijó este valor como el mínimo debido a la concentración inicial de  $Mg_2SO_4$  en el buffer de la Taq polimerasa utilizada.

El protocolo de PCR establecido mostró sensibilidad a partir de los 20 ng/ $\mu$ L de ADN en la reacción y bandas más notables a 25 ng/ $\mu$ L, ideales para secuenciación. La especificidad de los cebadores mostró ser del 100% al no amplificar ninguna banda inespecífica en todos los ensayos realizados.

Las secuencias recuperadas de BOLD Systems corresponden mayoritariamente a BINs provenientes de Canadá, Costa Rica, EEUU, Brasil y Sudáfrica, puesto que existe una ausencia de accesiones ecuatorianas del gen COI en GenBank, sin embargo, muchas de las especies utilizadas están presentes en el repertorio creado por Buestán et al. (2007) de tábanos en Ecuador, por lo que se puede asociar tábanos presentes en el país a este análisis.

Se optó por utilizar el método Neighbor-Joining debido a su uso frecuente en estudios de barcoding y la posibilidad que otorga para la identificación de especies crípticas en grupos de morfología compleja o inaccesible (Austerlitz et al., 2009). Este análisis usa específicamente genes de barcoding tal como COI para la realización de las inferencias filogenéticas y se basa en la construcción de matrices de similitud para generar los terminales con menor distancia genética posible (Peña, 2011). Se recalca que este método no considera la relación ancestro-descendientes ni el principio de descendencia con modificación, por lo que su uso se cierra netamente a la identificación de especies y su clasificación en

un grupo con las distancias de divergencia correspondientes (Saitou & Nei, 1987). Para estudios de sistemática filogenética, Peña (2011) recomienda el uso de árboles de máxima parsimonia, máxima verosimilitud o de inferencia Bayesiana. Más trabajos con secuencias de tábanos propios del país serán necesarios.

## Capítulo VI

### Conclusiones

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 se puede identificar especies de tábanos y agruparlas en función de la similitud de sus secuencias.

Se estandarizó un protocolo de extracción manual de ADN a partir de protocolos que no se han aplicado para tábanos previamente y se determinó 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, obteniendo concentraciones óptimas de ADN con una pureza (A260/A280) aceptada.

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).

### Recomendaciones

Se surge siempre realizar una inspección estereomicroscópica de las muestras a trabajar ya que muchas muestras pueden ser confundidas con tábanos a simple vista, además, se recomienda

utilizar muestras frescas de tábanos (dentro de un año desde su recolección) y correctamente almacenadas.

Trabajar con el insecto completo proporcionará una mayor cantidad de ADN, sin embargo, la cabeza de este proporcionará también un alto contenido de material genético, por lo que su uso es viable en caso de requerir del cuerpo para análisis morfológicos. La hidratación de las muestras será preferible realizarla en agua en caso de obtener poco ADN para así evitar la intervención de sales relacionadas a buffers de conservación en la PCR.

Es recomendable siempre trabajar con versiones compatibles de los programas bioinformáticos a utilizar 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.

## Capítulo VI

### Bibliografía

- Abdel-Latif, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0152-4>
- Alvarado Ramos, C. A. (2022). *Caracterización productiva de animales de interés zootécnico en la parroquia Tres de Noviembre*. <http://dspace.esepoch.edu.ec/handle/123456789/18121>
- Anahtar, M. N., Bowman, B. A., & Kwon, D. S. (2016). Efficient Nucleic Acid Extraction and 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Community Characterization. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 110, e53939. <https://doi.org/10.3791/53939>
- Anastácio, C., Bexiga, R., Nolasco, S., Zúquete, S., Delgado, I. L. S., Nunes, T., & Leitão, A. (2022). Impact of Endemic Besnoitiosis on the Performance of a Dairy Cattle Herd. *Animals*, 12(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ani12101291>
- Ashfaq, M., Khan, A. M., Rasool, A., Akhtar, S., Nazir, N., Ahmed, N., Manzoor, F., Sones, J., Perez, K., Sarwar, G., Khan, A. A., Akhter, M., Saeed, S., Sultana, R., Tahir, H. M., Rafi, M. A., Iftikhar, R., Naseem, M. T., Masood, M., ... Hebert, P. D. N. (2022). A DNA barcode survey of insect biodiversity in Pakistan. *PeerJ*, 10, e13267. <https://doi.org/10.7717/peerj.13267>
- Austerlitz, F., David, O., Schaeffer, B., Bleakley, K., Olteanu, M., Leblois, R., Veuille, M., & Laredo, C. (2009). DNA barcode analysis: A comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics*, 10(14), S10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-S14-S10>
- Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L. D., Duvallet, G., & Jittapalapong, S. (2014). Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 596-615. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.029>
- Banerjee, D., Kumar, V., Maity, A., Ghosh, B., Tyagi, K., Singha, D., Kundu, S., Laskar, B. A., Naskar, A., & Rath, S. (2015). Identification through DNA barcoding of Tabanidae (Diptera) vectors of surra disease in India. *Acta Tropica*, 150, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.023>
- BOLD Systems: Taxonomy Browser—Tabanidae {family}*. (s. f.). BOLD Systems. Recuperado 4 de junio de 2023, de [https://v3.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser\\_Taxonpage?taxid=465](https://v3.boldsystems.org/index.php/TaxBrowser_Taxonpage?taxid=465)
- Buestán, J. (1980). Identificación y distribución estacional de Tabanidae en las provincias de Guayas, Los Ríos y Canar. *Revista Ecuatoriana De Higiene Y Medicina Tropical*, 33, 101-116.
- Buestán, J., Navarrete, R., & Mejía Toro, M. (2007). Lista Actualizada de Tábanos del Ecuador. *Revista ecuatoriana de higiene y medicina tropical*, 44, 23-78.

- Burger, J. (s. f.). *Biodiversity Heritage Library*. Recuperado 4 de junio de 2023, de <https://www.biodiversitylibrary.org/creator/67272#/sections>
- Capinera, J. L. (Ed.). (2008). Tabanidae. En *Encyclopedia of Entomology* (pp. 3675-3675). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6\\_2341](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_2341)
- Cárdenas, R., & Vieira, J. (2005). *NUEVAS CITAS DE TABÁNIDOS (DIPTERA: TABANIDAE) PARA ECUADOR*.
- Carew, M. E., Metzeling, L., St Clair, R., & Hoffmann, A. A. (2017). Detecting invertebrate species in archived collections using next-generation sequencing. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 915-930. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12644>
- Carvajal L., V. (2020). *Introducción al conocimiento de los Tabanidae de importancia médica del Ecuador*. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/20903>
- Changbunjong, T., Prakaikowit, N., Maneephan, P., Kaewwiset, T., Weluwanarak, T., Chaiphongpachara, T., & Dujardin, J.-P. (2021). Landmark Data to Distinguish and Identify Morphologically Close *Tabanus* spp. (Diptera: Tabanidae). *Insects*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/insects12110974>
- Cilek, J. E. (2008). Horse Flies and Deer Flies (Diptera: Tabanidae). En J. L. Capinera (Ed.), *Encyclopedia of Entomology* (pp. 1856-1859). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6\\_1401](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_1401)
- Colihueque, N., Gantz, A., & Parraguez, M. (2021). Revealing the biodiversity of Chilean birds through the COI barcode approach. *ZooKeys*, 1016, 143-161. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1016.51866>
- Coscarón, S., & Papavero, N. (2014, octubre 15). *Key to the known immature stages of Neotropical Tabanidae*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Key-to-the-known-immature-stages-of-Neotropical-Coscaro%CC%81n-Papavero/62ca464ac1624a1041bf08918018b71042bf174c>
- Croof, H., Nour, M., & Ali, N. (2017). Morphological Identification of Horse Flies (Diptera: Tabanidae) and Estimation of their Seasonal Abundance in Al-Showak District, Gedaref State, Eastern Sudan. *IRA-International Journal of Applied Sciences (ISSN 2455-4499)*, 6, 41. <https://doi.org/10.21013/jas.v6.n2.p3>
- Cywinska, A., Hannan, M. A., Kevan, P. G., Roughley, R. E., Iranpour, M., & Hunter, F. F. (2010). Evaluation of DNA barcoding and identification of new haplomorphs in Canadian deerflies and horseflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(4), 382-410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00896.x>
- Dale, W. E., & Axtell, R. C. (1975). Flight of the salt marsh Tabanidae (Diptera), *Tabanus nigrovittatus*, *Chrysops atlanticus* and *C. fuliginosus*: Correlation with temperature, light, moisture and wind

- velocity. *Journal of Medical Entomology*, 12(5), 551-557.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/12.5.551>
- Davis, T. (2019). Improving Identification Methods for Tabanus Flies (Diptera: Tabanidae) from the Southeastern United States using DNA Barcoding & Environmental Niche Modeling. *Masters Theses*. [https://trace.tennessee.edu/utk\\_gradthes/5501](https://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/5501)
- Dörge, D. D., Cunze, S., & Klimpel, S. (2020). Incompletely observed: Niche estimation for six frequent European horsefly species (Diptera, Tabanoidea, Tabanidae). *Parasites & Vectors*, 13, 461.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04316-7>
- Fairchild, G. B., & Wilkerson, R. C. (1981). New Species of *Esenbeckia* (Proboscoides) (Diptera: Tabanidae) with a Key to the Subgenus. *Florida Entomologist*, 158-175.
- Flores-Pacheco, J. A., Median, S. M. A., Britton, D. M. T., & Martínez, R. A. C. (2018). Evaluación de trampas con atrayentes para la captura de dípteros. *Revista Científica de FAREM-Estelí*, 27, Article 27. <https://doi.org/10.5377/farem.v0i27.7057>
- Foil, L. D., & Hogsette, J. A. (1994). Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 13(4), 1125-1158.  
<https://doi.org/10.20506/rst.13.4.821>
- Freeman, J. (2011). Tabanidae and other Diptera on Camel's Hump Vermont: Ecological Observations. *ZooKeys*, 147, 559-576. <https://doi.org/10.3897/zookeys.147.1989>
- Frézal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.005>
- González, C. R. (2009). AGELANIUS CHILOENSIS, UNA NUEVA ESPECIE DE TÁBANO DEL SUR DE CHILE (DÍPTERA: TABANIDAE). *Gayana (Concepción)*, 73(1), 12-16. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382009000100002>
- Gutiérrez-López, R., Martínez-de la Puente, J., Gangoso, L., Soriguer, R. C., & Figuerola, J. (2015). Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, 40(1), 11-15.  
<https://doi.org/10.1111/jvec.12127>
- Jangra, S., & Ghosh, A. (2022). Rapid and zero-cost DNA extraction from soft-bodied insects for routine PCR-based applications. *PLoS ONE*, 17(7), e0271312.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271312>
- Koch, F. (2008). Brown, J. H. & Lomolino, M. V. (1998): Biogeography. 2nd Ed. Sunderland, Massachusetts (Sinauer Associates, Inc. Publishers). - 691 S. ISBN 0-87893-073-6 (hardcover), £ 35,95. *Zoosystematics and Evolution*, 76. <https://doi.org/10.1002/mmzn.20000760118>

- Krčmar, S., Hackenberger, D., & Hackenberger, B. (2011). Key to the horse flies fauna of Croatia (Diptera, Tabanidae). *Periodicum Biologorum*, 113, 5-33.
- Krčmar, S., Kučinić, M., Pezzi, M., & Mađarić, B. B. (2022). DNA barcoding of the horsefly fauna (Diptera, Tabanidae) of Croatia with notes on the morphology and taxonomy of selected species from Chrysopsinae and Tabaninae. *ZooKeys*, 1087, 141-161.  
<https://doi.org/10.3897/zookeys.1087.78707>
- Krinsky, W. L. (1976). Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical Entomology*, 13(3), 225-275.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/13.3.225>
- Leonel, J. A. F., Vioti, G., Alves, M. L., da Silva, D. T., Meneghesso, P. A., Benassi, J. C., Spada, J. C. P., Galvis-Ovallos, F., Soares, R. M., & Oliveira, T. M. F. de S. (2020). DNA extraction from individual Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) specimens: Which is the method with better results? *Experimental Parasitology*, 218, 107981.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107981>
- Lessard, B. D., Cameron, S. L., Bayless, K. M., Wiegmann, B. M., & Yeates, D. K. (2013). The evolution and biogeography of the austral horse fly tribe Scionini (Diptera: Tabanidae: Pangoniinae) inferred from multiple mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(3), 516-540. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.04.030>
- Liu, M., Wu, T., Ju, H., Ma, X., Fang, Z., & Chang, Q. (2022). Phylogenetic Analysis of Mitochondrial Genome of Tabanidae (Diptera: Tabanidae) Reveals the Present Status of Tabanidae Classification. *Insects*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/insects13080695>
- Lucas Fonseca, M. A. (2019). *Diversidad y estacionalidad de las especies de tábanos (Diptera: Tabanidae) en Uruguay*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/23957>
- Mackerras, I. M., Spratt, D. M., & Yeates, D. K. (2008). Revision of the horse fly genera *Lissimas* and *Cydistomyia* (Diptera: Tabanidae: Diachlorini) of Australia. *Zootaxa*, 1886(1), 1.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.1886.1.1>
- Manrique-Saide, P. C., Briceño-UC, Á. R., Ibáñez-Bernal, S., & Sandoval-Ruiz, C. A. (2012). Tábanos (Diptera: Tabanidae) de la selva mediana del sur de Yucatán, México. *Acta zoológica mexicana*, 28(3), 497-506.
- Marquina, D., Buczek, M., Ronquist, F., & Łukasik, P. (2021). The effect of ethanol concentration on the morphological and molecular preservation of insects for biodiversity studies. *PeerJ*, 9, e10799.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.10799>
- Morales Briceño, A., Méndez Sánchez, A., & Morales Briceño, M. (2015). Anemia Infecciosa Equina: Una Revisión. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 46(1-2), 107-124.

- Moritz, C., & Cicero, C. (2004). DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PLOS Biology*, 2(10), e354. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020354>
- Mugasa, C. M., Villinger, J., Gitau, J., Ndungu, N., Ciosi, M., & Masiga, D. (2018). Morphological re-description and molecular identification of Tabanidae (Diptera) in East Africa. *ZooKeys*, 769, 117-144. <https://doi.org/10.3897/zookeys.769.21144>
- Mugasa, C. M., Villinger, J., Gitau, J., Ndungu, N., Marc Ciosi, & Masiga, D. (2018). Morphological re-description and molecular identification of Tabanidae (Diptera) in East Africa. *ZooKeys*, 769, 117-144. <https://doi.org/10.3897/zookeys.769.21144>
- Mulandane, F. C., Snyman, L. P., Brito, D. R. A., Bouyer, J., Fafetine, J., Van Den Abbeele, J., Oosthuizen, M., Delespaux, V., & Neves, L. (2020). Evaluation of the relative roles of the Tabanidae and Glossinidae in the transmission of trypanosomosis in drug resistance hotspots in Mozambique. *Parasites & Vectors*, 13(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04087-1>
- Mullens, B. A. (2019a). Chapter 16—Horse Flies and Deer Flies (Tabanidae). En G. R. Mullen & L. A. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* (pp. 327-343). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00016-9>
- Mullens, B. A. (2019b). Chapter 16—Horse Flies and Deer Flies (Tabanidae). En G. R. Mullen & L. A. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* (pp. 327-343). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00016-9>
- Najera-Cortazar, L. A., Keen, A., Kitching, T., Stokes, D., & Goodman, S. J. (2023). Phylogenetic analyses reveal bat communities in Northwestern Mexico harbor a high diversity of novel cryptic ectoparasite species. *Ecology and Evolution*, 13(2), e9645. <https://doi.org/10.1002/ece3.9645>
- Neves, L. C. B. G., u17396434@tuks.co.za, Lempereur, L., & Mazibuko, X. (2018). *Species composition of and detection of haemoparasites in horse-flies (Diptera: Tabanidae) in south-eastern Kruger National Park*. <https://repository.up.ac.za/handle/2263/70405>
- Oliveira, P. V., dos Santos, A. R., Olive, E. L., Britto, K. B., de Almeida, F. A. N., Pacheco da Silva, V. C., Machado, C. B., Fornazier, M. J., Ventura, J. A., Culik, M. P., & Paneto, G. G. (2023). Molecular Species Delimitation Using COI Barcodes of Mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) from Coffee Plants in Espírito Santo, Brazil. *Diversity*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/d15020305>
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265-267.
- Post, R. J., Flook, P. K., & Millest, A. L. (1993). Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(1), 85-92. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90012-G](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90012-G)



- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sarwar, M. (2020). Typical Flies: Natural History, Lifestyle and Diversity of Diptera. En *Life Cycle and Development of Diptera*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91391>
- Service, M. (2012). *Medical Entomology for Students* (5.<sup>a</sup> ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139002967>
- Sevidzem, S. L., Koumba, A. A., Yao-Acapovi, G. L., & Mavoungou, J. F. (2021). A nationwide survey of the tabanid fauna of Cameroon. *Parasites & Vectors*, 14(1), 392. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04894-0>
- Strother, S. (1999). Genus Tabanus. Tabanids (horseflies). What is this insect and how does it affect man? *Dermatology Online Journal*, 5(2), 6.
- Zapata Salas, R., Zuluaga, E. C., Vélez, J. R., Chávez, O. T., García, V. P., Osorio, L. R., Rosales, R. B., & Echeverry, D. P. (2017). Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: Primer informe de Haematobia irritans como principal vector de T. vivax y T. evansi en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, 1(33), 21-34. <https://doi.org/10.19052/mv.4048>