



**Optimización de las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia**

**Tabanidae del marcador molecular 28S**

Gaona Quinde, Andrea Patricia

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Martin Solano Sarah, Ph.D.

31 de agosto del 2023



### GAONA\_ANDREA\_TRABAJO DE TITULA...

#### Scan details

Scan time: August 28th, 2023 at 9:43 UTC      Total Pages: 51      Total Words: 12532

#### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	1.1%	133
● Minor Changes	0.4%	47
● Paraphrased	1.9%	240
● Omitted Words	30%	3758

#### AI Content Detection



Text coverage  
● AI text  
● Human text

#### Alerts: (1)

##### Cross Language: Same Document Language

Submitted language and cross-language text are the same language. No credits were used.

2/5 Severity



Firma:

.....

Martin Solano, Sarah

Director



**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 28S”** fue realizado por la señorita **Gaona Quinde, Andrea Patricia**, 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, 31 de agosto 2023

Firma:

.....

Martin Solano, Sarah

C. C 172722172



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Gaona Quinde, Andrea Patricia**, con cédula de ciudadanía N°1105867970, 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 28S"**, 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, 31 de agosto de 2023

**Gaona Quinde, Andrea Patricia**

C.C: 1105867970



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

**Carrera de Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Gaona Quinde, Andrea Patricia**, con cédula de ciudadanía N°1105867970, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Optimización de las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia Tabanidae del marcador molecular 28S"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 31 de agosto de 2023

**Gaona Quinde, Andrea Patricia**

C.C: 1105867970

### **Dedicatoria**

Dedico el presente trabajo a mis padres, hermanas, tías y abuelas por ser fuente de inspiración y amor hacia mí. A toda mi familia le dedico este logro, cada uno ha dejado una huella imborrable en mí y su sacrificio y apoyo se ha convertido en los pilares que me han sostenido en este camino.

Gracias por ser mi inspiración constante.

*Andrea Patricia Gaona Quinde*

### **Agradecimiento**

A mis padres y hermanas por creer y estar siempre pendientes de mí. Su ejemplo de amor, paciencia y dedicación han sido fundamentales para moldear la persona en la que me he convertido hoy en día.

A Santiago, por hacer que este viaje fuera más significativo y especial.

A mis amigos, quienes han estado conmigo con sus risas, tardes de estudio y palabras de ánimo recordándome la importancia de aprovechar cada etapa.

A mi tutora, Sarah Martin Solano, cuya valiosa ayuda fue fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Además, le estoy agradecida por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio de biotecnología animal e integrarme temporalmente a su equipo de investigación.

A Cristina Cholota, por su paciencia y buen humor, mismos que hicieron más llevadero el trabajo dentro del laboratorio.

A la Universidad de Liège y a la Academia de Investigación y Educación Superior (ARES) por la apertura a la participación en el Proyecto de Investigación y Desarrollo para el estudio de la Brucelosis y Tripanosomiasis bovina (BruTryp).

Y a todos quienes han colaborado para la culminación de este proceso.

*Andrea Patricia Gaona Quinde*

## Índice de Contenidos

Resultados del Software Copyleaks Plagiarism report.....	2
Certificación .....	3
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de Contenidos .....	8
Índice de Tablas .....	10
Índice de Figuras .....	11
Resumen .....	12
Abstract.....	13
Capítulo I: Introducción .....	14
Formulación del problema.....	14
Justificación del problema. ....	15
Hipótesis .....	17
Objetivos .....	17
<i>Objetivo general</i> .....	17
<i>Objetivos específicos</i> .....	17
Capítulo II: Revisión de literatura .....	18
Tabanidae.....	18
Ciclo de vida .....	20
<i>Huevo</i> .....	21
<i>Larva</i> .....	21
<i>Pupa</i> .....	22
<i>Adulto</i> .....	23
Clasificación taxonómica.....	23
Impacto Económico .....	25
DNA barcoding .....	26
Gen 28S en filogenia .....	29
Capítulo III: Materiales y métodos.....	33
Selección de especímenes de la familia Tabanidae a partir de su morfología. ....	33
Protocolo de extracción de ADN.....	34
Cuantificación de ADN .....	35



Análisis estadístico .....	36
Optimización de PCR para el gen 28S .....	36
Electroforesis en gel.....	37
Purificación de bandas para secuenciación .....	37
Alineamiento de la secuencia obtenida.....	38
Capítulo IV: Resultados .....	39
Identificación morfológica de especímenes de la familia Tabanidae .....	39
Extracción de ADN .....	40
Amplificación del gen 28S en especímenes de la familia Tabanidae.....	52
Análisis filogenético .....	56
Capítulo VI: Discusión .....	59
Extracción de ADN .....	59
Amplificación del gen 28S en especímenes de la familia Tabanidae.....	60
Análisis filogenético .....	61
Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones .....	62
Capítulo VI: Referencias.....	63

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de la familia Tabanidae .....	24
<b>Tabla 2.</b> Impacto económico de las moscas de los establos en las industrias ganaderas en los EE. UU....	25
<b>Tabla 3.</b> Protocolos sometidos a pruebas para estandarizar la extracción de ADN utilizando kit. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Primers utilizados para la amplificación del gen 28S.....	36
<b>Tabla 5.</b> Protocolo para la amplificación del gen 28S.....	37
<b>Tabla 6.</b> Cuantificación de la muestra de ADN obtenida al realizar el protocolo original.....	40
<b>Tabla 7.</b> Primer volumen y tiempo de incubación evaluados.....	41
<b>Tabla 8.</b> Resultado de la cuantificación al evaluar la segunda concentración y tiempo de incubación de RNAsa utilizados.....	42
<b>Tabla 9.</b> Cuantificación de ADN después de la segunda concentración evaluada de RNAsa .....	43
<b>Tabla 10.</b> Tabla utilizada para el análisis estadístico .....	44
<b>Tabla 11.</b> ANOVA de la concentración de ADN obtenida. ....	45
<b>Tabla 12.</b> Prueba de Tukey para la interacción concentración de RNAsa y tiempo. ....	45
<b>Tabla 13.</b> Cuantificación del ADN obtenido al realizar modificaciones dentro del protocolo seleccionado .....	46
<b>Tabla 14.</b> ANOVA de la concentración de ADN obtenida al comparar las variaciones en ambos protocolos. ....	47
<b>Tabla 15.</b> Prueba de Tukey para la interacción entre la concentración de RNAsa utilizada y el tiempo de incubación.....	48
<b>Tabla 16.</b> Cuantificación del ADN obtenido de diferentes secciones de los insectos. ....	48
<b>Tabla 17.</b> Cuantificación del ADN obtenido de los especímenes identificados como Tabanidae .....	50
<b>Tabla 18.</b> Protocolo optimizado para la amplificación del gen 28S en especímenes pertenecientes a la familia Tabanidae.....	54
<b>Tabla 19.</b> Lista de especímenes pertenecientes a la familia Tabanidae incluidos en este estudio.....	56

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mosca del caballo ( <i>Tabanus trimaculatus</i> ) .....	18
<b>Figura 2.</b> Morfología de la cabeza de la mosca del caballo, <i>Tabanus</i> sp. ....	19
<b>Figura 3.</b> Empodio pulviliforme .....	19
<b>Figura 4.</b> Masa de huevos de la mosca del venado, <i>Chrysops</i> sp. ....	21
<b>Figura 5.</b> Larva típica de Tabanidae .....	22
<b>Figura 6.</b> Pupa típica de Tabanidae. Tomado de: Squitier, 2021 .....	22
<b>Figura 7.</b> Ala de los tabánidos adultos .....	23
<b>Figura 8.</b> Consenso de tres árboles parsimoniosos del ADN ribosómico 28S .....	31
<b>Figura 9.</b> Características morfológicas de la familia Tabanidae.....	33
<b>Figura 10.</b> Moscas identificadas como familia Tabanidae .....	39
<b>Figura 11.</b> Muestras identificadas como familia Tabanidae junto al grupo excluyente ( <i>Rhagionidae</i> ) ....	40
<b>Figura 12.</b> Visualización en gel de agarosa de los protocolos de extracción comparados.....	41
<b>Figura 13.</b> Primera prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón .....	42
<b>Figura 14.</b> Segunda prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón .....	43
<b>Figura 15.</b> Tercera prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón .....	44
<b>Figura 16.</b> Variaciones en los dos protocolos de extracción comparados.....	46
<b>Figura 17.</b> ADN extraído de diferentes secciones del cuerpo.....	49
<b>Figura 18.</b> ADN extraído de patas de insectos identificados como Tabanidae .....	49
<b>Figura 19.</b> ADN extraído de especímenes de la familia Tabanidae junto al grupo excluyente .....	51
<b>Figura 20.</b> Gradiente de temperatura evaluado para la amplificación del gen 28S .....	52
<b>Figura 21.</b> Gradiente de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) evaluado en el protocolo de PCR.....	52
<b>Figura 22.</b> Gradiente de la concentración de primers utilizado .....	53
<b>Figura 23.</b> Gradiente de ADN polimerasa evaluada para la amplificación del gen 28S.....	54
<b>Figura 24.</b> PCR para la amplificación del gen 28S en especímenes de la familia Tabanidae .....	55
<b>Figura 25.</b> Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA .....	57

## Resumen

La familia Tabanidae está distribuida alrededor de casi todo el mundo y es conocida por incluir vectores de enfermedad humanas y animales, como la tripanosomiasis, lo que causa un gran impacto económico y social en la industria ganadera debido a daños directos en el animal como por las molestias posteriores que generan. El estudio se centró en mejorar la identificación de los insectos pertenecientes a esta familia para fortalecer y adaptar estrategias de control efectivas. Se utilizó una visualización con estereomicroscopio en conjunto con claves dicotómicas establecidas para Tabanidae. Posteriormente, se optimizó un protocolo de extracción de ácido desoxirribonucleico utilizando el kit Wizard de Promega diseñado para tejido animal de cola de ratón, con resultados que indican una pureza A260/A230 de  $1.812 \pm 0.113$ , pureza A260/A280 de  $1.143 \pm 0.391$  y una concentración promedio de 756.93 microgramos por mililitro de ácido desoxirribonucleico. Se desarrolló un análisis utilizando técnicas moleculares para amplificar el gen ribosomal 28S en insectos, y se identificó la presencia de amplicones en los 10 especímenes. Finalmente, se llevó a cabo una inferencia filogenética utilizando secuencias del gen 28S obtenidas de una base de datos. Este estudio ha permitido optimizar un protocolo completo de extracción de material genético y amplificación para la identificación de la familia Tabanidae, utilizando el marcador molecular 28S en muestras recolectadas en diversas regiones del Ecuador, incluyendo la costa, la sierra y el oriente, lo que contribuye significativamente al conocimiento y manejo de esta familia de insectos de importancia médica y agrícola.

*Palabras clave:* Tabanidae, 28S, filogenia

### **Abstract**

The family Tabanidae is distributed throughout most of the world and is known to include vectors of human and animal diseases, such as trypanosomiasis, which causes a great economic and social impact on the livestock industry due to direct damage to the animal and subsequent discomfort. The study focused on improving the identification of insects belonging to this family to strengthen and adapt effective control strategies. Stereomicroscopic visualization was used in conjunction with established dichotomous keys for Tabanidae. Subsequently, a deoxyribonucleic acid extraction protocol was optimized using Promega's Wizard kit designed for mouse tail animal tissue, with results indicating A260/A230 purity of  $1.812 \pm 0.113$ , A260/A280 purity of  $1.143 \pm 0.391$  an average concentration of 756.93 micrograms per milliliter of deoxyribonucleic acid. Analysis using molecular techniques was developed to amplify the 28S gene in insects, and the presence of amplicons was identified in all 10 specimens. Finally, phylogenetic inference was carried out using 28S gene sequences obtained from a database. This study has allowed us to optimize a complete protocol for the extraction of genetic material and amplification for the identification of the Tabanidae family, using the 28S molecular marker in samples collected in various regions of Ecuador, including the coast, the mountains and the east, which contributes significantly to the knowledge and management of this family of insects of medical and agricultural importance.

*Key words:* Tabanidae, 28S, phylogenetic

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

Los especímenes pertenecientes a la familia Tabanidae se encuentran en casi todo el mundo (García Más et al., 2009); los tábanos machos se alimentan de plantas o cuerpo de otros insectos (Ricci & Margaría, 2022) mientras que las hembras de todas las especies chupan sangre (Villacide, 2012), de manera que el impacto negativo de estos insectos chupadores de sangre sobre el ganado se ha visto relacionado con la hematofagia (Boonsaen et al., 2021), el comportamiento alimentario, el tamaño y la abundancia de los insectos (Desquesnes et al., 2022). Estos insectos se consideran una plaga para las personas y para el ganado por su mordedura dolorosa y persistente (Baldacchino et al., 2014).

Se ha comprobado el impacto negativo significativo de las moscas hematófagas sobre la salud (Boonsaen et al., 2021), el aumento de peso, la eficiencia alimenticia del ganado de carne y el crecimiento del ganado (Taylor et al., 2012). Sin embargo, se deben tomar en cuenta también las consecuencias que tienen este tipo de plagas sobre las industrias relacionadas puesto que ha incrementado con el tiempo (Taylor et al., 2012) por ejemplo, el impacto económico en la producción ganadera de Estados Unidos en 1922 fue de \$608 millones mientras que para 2012 fue de \$2,211 millones (Taylor et al., 2012).

En este sentido, los especímenes más importantes económicamente están dentro del orden Diptera, suborden Nematocera y Brachycera (Boonsaen et al., 2021) y, dentro de este último los tabánidos (Baldacchino et al., 2014; Boonsaen et al., 2021). Pese a que su dinámica poblacional cambia suelen mostrar un pico estacional de 3 a 5 meses convirtiéndose en un problema para el ganado (Desquesnes et al., 2022).

De modo que, la presente investigación se centra en la optimización de herramientas moleculares que permitan identificar los insectos de la familia Tabanidae y obtener una caracterización molecular a través de la secuenciación del gen 28S rRNA.

### **Justificación del problema.**

Los dípteros se caracterizan por tener un solo par de alas puesto que sus alas posteriores se transformaron en unos órganos llamados halterios o balancines que les ayudan a mantener la estabilidad mientras vuelan (Carles-Tolra, 2015). Los tábanos son insectos del orden Diptera suborden *Brachycera*, que varían en color, según las marcas en el cuerpo y el tamaño que puede ir entre 9 y 33 mm (Foil & Hogsette, 1994).

A nivel nacional, revisiones acerca de la fauna ecuatoriana de tabánidos registran 198 especies con 2 subespecies y 5 variedades pertenecientes a 33 géneros, 5 tribus y 3 subfamilias de las cuales el 2.1% serían endémicas de Ecuador (Cárdenas et al., 2009). En 2021, se descubrió una nueva especie de tábano denominada *Acanthocera buestani* en Napo, Ecuador (Pazmiño-Palomino et al., 2021).

Al considerarse una plaga difícil de controlar sobre todo por su ciclo de vida, se han establecido algunas estrategias como utilizar repelentes, manipular los hábitats de las larvas o trampas permanentes (Foil & Hogsette, 1994). Los tábanos son activos principalmente en las estaciones calurosas, cuando la humedad relativa y la temperatura son altas (García Más et al., 2009; Salamanca-Carreño et al., 2020). Se ha reportado su papel en la transmisión de al menos 35 enfermedades animales (Baldacchino et al., 2014; Krinsky, 1976; Lucas et al., 2020; Service, 2012). La tripanosomiasis se caracteriza por su presencia en zonas tropicales donde existen vectores como los tábanos relacionados con la infestación vía bucal en bovinos (García Pincay, 2017).

Para valorar a los tábanos como plagas, el primer paso es mejorar las técnicas de identificación disponibles (Davis, 2019). Al momento, la identificación de tábanos se basa en el análisis de la

morfología (Crooft et al., 2017; Mugasa et al., 2018) lo que implica habilidades y conocimientos taxonómicos especializados. Algunas especies de tábanos se identifican de manera errónea ya que son morfológicamente similares (Changbunjong et al., 2018).

Al ser parásitos hematófagos, su correcta identificación es clave en la determinación del rol que tienen en la transmisión de enfermedades como en el desarrollo de estrategias de control y manejo de los mismos (Changbunjong et al., 2021). El control de los tabánidos es difícil, ya que en una zona determinada existen múltiples especies con diferentes ocurrencias estacionales y características biológicas (Crooft et al., 2017). Es aquí donde toman relevancia los métodos moleculares que se consideran rápidos y precisos para ser utilizados en insectos (Changbunjong et al., 2018).

La identificación utilizando ADN como el barcoding ya se ha utilizado para algunos especímenes de *Tabanus* spp. (Banerjee et al., 2015; Krčmar et al., 2022), a excepción de *T. striatus* (Changbunjong et al., 2018), ya se han desarrollado bases de datos con ADN barcoding para especies del género *Tabanus* y modelos de distribución (Davis, 2019).



**Hipótesis**

El marcador molecular 28s es útil para la identificación de insectos de la familia Tabanidae.

**Objetivos*****Objetivo general***

Optimizar las herramientas moleculares para la identificación de insectos de la familia Tabanidae del marcador molecular 28S.

***Objetivos específicos***

- Determinar las condiciones óptimas para la extracción de ADN evaluando diferentes protocolos para la identificación de insectos de la familia Tabanidae.
- Establecer el protocolo de PCR Barcoding para insectos de la familia Tabanidae utilizando la región parcial 28S.
- Inferir la filogenia de la familia Tabanidae con las secuencias del gen parcial 28S disponibles en bases de datos para contrastar con la información de especies ya descritas.

## Capítulo II: Revisión de literatura

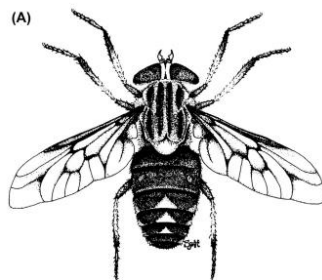
### Tabanidae

Tabanidae es una familia de dípteros, también llamados tábanos elefante, tábanos búfalo, tábanos alce, tábanos ciervo o tábanos cabeza verde, conformada por moscas con hábitos de succión de sangre que representan una importancia médica veterinaria (Chainey, 1993). A nivel mundial se incluyen alrededor de 4000 especies descritas. Estas especies se encuentran en casi todos los continentes a excepción de la Antártida colonizando incluso islas remotas como las Galápagos o el archipiélago de Melanesia (Mullens, 2019). Además, presentan mayor diversidad en las zonas tropicales (Crooft et al., 2017).

Los tabánidos presentan un tamaño entre 6-30 mm de longitud (Berenger & Parola, 2017), suelen ser robustas y de constitución pesada (figura 1). Las moscas picadoras más grandes presentan una envergadura alar de 65 mm (Service, 2012). En cuanto a la coloración puede variar entre marrón oscuro o negro hasta marrón rojizo más claro, amarillo o verdoso (Berenger & Parola, 2017; Service, 2012).

### Figura 1

*Mosca del caballo (Tabanus trimaculatus)*



*Nota.* La gráfica muestra la vista dorsal de un espécimen hembra adulta de *Tabanus trimaculatus*.

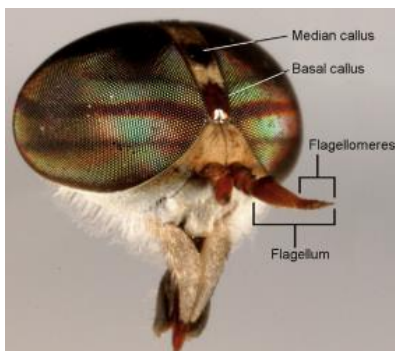
*Tomado de:* B. A. Mullens, 2019.

Su cabeza es grande y se describe como semicircular o semilunar (Service, 2012). La cabeza presenta un par de ojos compuestos que, cuando están vivas, son iridiscentes en tonos verdes,

amarillos, naranjas y violetas (Mullens, 2019; Service, 2012), dispuestos en bandas, zigzags o manchas (figura 2) (Service, 2012).

### Figura 2

*Morfología de la cabeza de la mosca del caballo, Tabanus sp.*



*Nota.* La figura muestra la morfología de la cabeza y las antenas de la mosca del caballo, *Tabanus sp.*, señalando caracteres taxonómicos importantes. Tomado de: B. A. Mullens, 2019.

Los especímenes de esta familia presentan características distintivas como: antenas en forma de hoz con el tercer segmento anulado, empodio pulviliforme y la cuarta y quinta venas radiales que terminan a los costados del ala (figura 3) (Banerjee et al., 2017).

### Figura 3

*Empodio pulviliforme*



*Nota.* Estructura del empodio pulviliforme característica de la familia Tabanidae. Tomado de: R. G. Beutel & S. N. Gorb, 2001.

Las hembras de la mayoría de las especies de Tabanidae atacan a mamíferos, principalmente équidos (Caro et al., 2019), bóvidos (Perich et al., 1986) y humanos (Mullens, 2019). Suelen ser selectivos al momento del ataque a ciertas regiones corporales específicas de sus hospedadores y se pueden sentir atraídos por el color y la forma (Mullens, 2019), principalmente por colores contrastados y objetos tridimensionales oscuros (Mullens, 2019).

Son dípteros hematófagos que al ser vectores mecánicos de patógenos disminuyen la producción ganadera. Las pérdidas económicas (Boonsaen et al., 2021; Lucas et al., 2020) se deben a la irritación, estrés y pérdida de sangre principalmente en bovinos o equinos. El tamaño de su cavidad bucal les permite causar mordeduras dolorosas en los animales afectando la producción (Barbet, 2014) al impedir que los animales coman, lo que reduce la tasa de crecimiento (Perich et al., 1986), el aumento de peso (Lucas et al., 2020) y la producción de leche (CABI, 2019).

La mordedura puede predisponer a otras infecciones que llevaría a pérdidas en la calidad de la piel (Mugasa et al., 2018). Son conocidos por ser importantes vectores mecánicos de virus, bacterias, protozoos, helmintos (Baldacchino et al., 2014; Birhanu, 2020; Mugasa et al., 2018; Mullens, 2019) y de patógenos animales importantes como la anaplasmosis (Hawkins et al., 1982) y la anemia infecciosa equina (Foil et al., 1983), el carbunco o la tripanosomiasis (Chainey, 1993). En cuanto a enfermedades humanas asociadas a tábanos se sabe que pueden transmitir la loiasis (Cheke et al., 2003) y la tularemia (Petersen et al., 2009). La transmisión de estos patógenos se produce por especies de tábanos de los géneros *Tabanus*, *Haematopota* y *Chrysops* (Mullens, 2019).

### **Ciclo de vida**

Tabanidae tiene un ciclo de cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto.

### **Huevo**

Los estadios inmaduros pueden hallarse en lugares húmedos como arroyos (Banerjee et al., 2017) o en regiones arbustivas cercanas como los tallos de plantas emergentes alrededor de los humedales y en el envés de las hojas (figura 4) (Hill & MacDonald, 2019; Wallace, 2009).

Los tábanos colocan una masa de entre 100 y 800 huevos en superficies verticales (Jones & Anthony, 1964). Los huevos presentan una forma cilíndrica y cónica a los extremos, miden de 1 a 2.7 mm y pueden presentar colores blancos, amarillentos, verdes, marrón rojizo o negro según la especie (Banerjee et al., 2017).

### **Figura 4**

*Masa de huevos de la mosca del venado, Chrysops sp.*



*Nota.* Masa de huevos de la mosca del venado, *Chrysops* sp., después del oscurecimiento. Tomado de: Squitier, 2021.

### **Larva**

Los estadios larvarios son encontrados en una gran variedad de hábitats acuáticos (Sarwar, 2020), tales como: pequeños riachuelos, estuarios (Courtney & Merritt, 2009), estanques (Lane, 1976) aunque también pueden encontrarse en otros hábitats como material vegetal en descomposición (Hill & MacDonald, 2019). La duración del estado larvario puede ser hasta de un año. En este período se alimentan de pequeños moluscos y detritus (Gray, 2008)(Carvajal López, 2002) así como de pequeños animales de estructura blanda como larvas de insectos o gusanos (Hill & MacDonald, 2019).

Se estrechan en cada extremo y suelen ser de color blanquecino, marrón o verde según la especie y puede incluir bandas negras alrededor de cada segmento del cuerpo (figura 5) (Squitier, 2021). La larva respira a través de un sifón traqueal ubicado en su extremo posterior (McAlpine et al., 1981). La larva tiene una cabeza pequeña y de 11 a 12 segmentos adicionales (Squitier, 2021).

### **Figura 5**

*Larva típica de Tabanidae*



*Nota. Morfología característica de larvas de Tabanidae. Tomado de: Squitier, 2021*

### **Pupa**

El estado de pupa está caracterizado por ser breve (Wallace, 2009) y darse en lugares secos (figura 6) (Bonet & Vega, 1990). La duración de la fase larval puede variar de unas pocas semanas a más de un año, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales (Gray, 2008). Habita en lugares menos húmedos que los frecuentados por las larvas y su período es corto, generalmente no pasa de unos días o pocas semanas (Capinera, 2008).

### **Figura 6**

*Pupa típica de Tabanidae. Tomado de: Squitier, 2021*



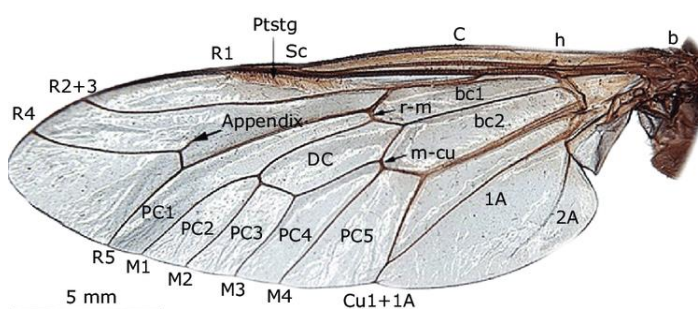
*Nota. Morfología característica de insectos Tabanidae en estadio de pupa. Tomado de: Squitier, 2021.*

## Adulto

En la mayoría de las especies, los machos emergen antes que las hembras (Axtell, 1976). Los adultos son moscas de cuerpo robusto y bastante grande (Service, 2012). Las antenas son prominentes y se extienden anteriormente (Tidwell, 1970). Con 3 segmentos que muestran anulaciones en el segmento terminal (Axtell, 1976). La venación de las alas se presenta en las ramas R4 y R5 (figura 7) (Axtell, 1976).

## Figura 7

*Ala de los tabánidos adultos*



*Nota.* Anatomía general del ala de los tabánidos adultos. Tomado de: (Banerjee et al., 2017).

Incluye una amplia distribución desde el margen de la costa hasta los Andes (Guimarães et al., 2017). Pueden tener hábitos diurnos, crepusculares y nocturnos según la especie (Mullens, 2019). Las hembras tienen piezas bucales bastante desarrolladas para poder cumplir con su demanda alimenticia presentando maxilares robustos y mandíbulas como cuchillas (Axtell, 1976).

## Clasificación taxonómica

Las características morfológicas generalizada de los tabánidos y rareza de los machos ha dificultado su clasificación (Morita et al., 2016). En un inicio, los Tabanidae se dividieron en diez tribus y cuatro subfamilias, basadas en la morfología genital adulta, de modo que sean: *Chrysopsinae* (*Bouvieromyiini*, *Chrysopsini*, *Rhinomyzini*), *Pangoniinae* (*Pangoniini*, *Philolichini*, *Scionini*), *Tabaninae* (*Diachlorini*, *Haematopotini*, *Tabanini*) y *Scepsidinae* (Mackerras, 1954). Los Tabanidae pertenecen al

orden de insectos Diptera, clasificándose en la superfamilia *Tabanoidea* donde junto con *Rhagionoidea*, constituye el infraorden *Tabanomorpha* (tabla 1) (Morita et al., 2016).

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de la familia Tabanidae*

<b>Reino</b>	<b>Animalia</b>
<b>Phylum</b>	Arthropoda
<b>Clase</b>	Insecta
<b>Orden</b>	Diptera
<b>Suborden</b>	<i>Brachycera</i>
<b>Infraorden</b>	<i>Orthorrhapha</i>
<b>Superfamilia</b>	<i>Tabanomorpha</i>
<b>Familia</b>	Tabanidae

*Nota.* Esta tabla muestra la clasificación taxonómica de la familia Tabanidae jerárquicamente desde el reino hasta familia. Adaptado de: Facultad de Biología UCM, 2004.

La familia Tabanidae incluye cerca de 4000 especies y subespecies en 133 géneros en todo el mundo de las cuales el 27.3% pertenecen a la Región Neotropical (Coscarón & Martínez, 2019). La familia Tabanidae se subdivide en cuatro subfamilias: *Chrysopsinae*, *Pangoniinae*, *Scepsidinae* y *Tabaninae*, siendo las subfamilias *Chrysopsinae* y *Tabaninae* las más importantes en la transmisión de enfermedades (M. W. Service, 1980). La subfamilia *Tabaninae* incluye los tábanos, representados por los géneros *Tabanus* e *Hybomitra* (Axtell, 1976).

Las hembras de especies de *Haematopota* junto con *Tabanus* e *Hybomitra*, son plagas importantes (Mullens, 2019). Además de que *Tabanus* sea uno de los géneros más diversos del orden Diptera (Morita et al., 2016), se le considera el grupo con mayor presencia en la mayoría de los lugares a excepción del extremo norte (Mullens, 2019).

En Argentina se han descrito 350 especies de Tabanidae (Coscarón & Martínez, 2019), en Chile 110 especies (Coscarón & González, 1991) y en Brasil 489 (Krolow & Henriques, 2023), mientras que en



Ecuador se han reportado alrededor de 200 especies, agrupadas en 29 géneros, 5 tribus y 3 subfamilias (Lucas Fonseca, 2019).

### **Impacto Económico**

Según el impacto económico sobre el ganado se pueden clasificar en cuatro moscas comunes: la mosca de los cuernos, la mosca de la cara, la mosca de los establos y los tábanos (Stark, 2017). Los parásitos externos en el ganado provocan pérdidas sustanciales que pueden exceder los \$2 mil millones anuales en Estados Unidos (Byford et al., 1992) y se asocian a la pérdida de sangre y posteriores molestias (Derek Scasta et al., 2015).

Pese a no tener un número exacto, se han propuesto estimaciones en las pérdidas económicas que van de los 152 a los 930 millones de dólares en el 2019 en Estados Unidos (tabla 2) (Taylor et al., 2012) a consecuencia de los cambios en inventario de ganado o valores de los productos lácteos.

**Tabla 2**

*Impacto económico de las moscas de los establos en las industrias ganaderas en los EE. UU.*

Fuente	Dólares (millones)	
	2009	2012
<b>Hyslop, 1938</b>	152	10
<b>USDA, 1954</b>	160	20
<b>USDA, 1956</b>	967	142
<b>Drummond et al., 1981</b>	939	398
<b>Drummond, 1987</b>	808	428
<b>Kunz et al., 1991</b>	680	432
<b>Byfrod et al., 1992</b>	930	608
<b>Taylor et al., 2012</b>	2.211	-

*Nota.* La tabla presenta las estimaciones del impacto económico de las moscas de los establos en las industrias ganaderas en Estados Unidos en los años 2009 y 2012. Adaptado de Taylor et al., 2012.

## DNA barcoding

Identificar y clasificar especímenes ha sido desde siempre el pilar de los estudios biológicos y nomenclatura de las especies (Frézal & Leblois, 2008). Se ha dicho que es importante definir los límites entre las especies así como su correcta identificación para comprender la diversidad de las mismas y descifrar si son miembros del mismo grupo o no (Frézal & Leblois, 2008).

La identificación a partir de ADN está ya establecida y podría incluso ser considerada una “norma de identificación” en muchos grupos taxonómicos pese a que se ha dicho que podría disminuir la taxonomía al no seguir las hipótesis de clasificación de especies (Besansky et al., 2003). El Barcode de ADN surge como una alternativa para afrontar las dificultades que surgieron al momento de identificar las diferentes especies (Frézal & Leblois, 2008).

La técnica partió del uso de un conjunto de cebadores que amplificaban una región de 648 pares de bases provenientes del gen mitocondrial COI buscando garantizar la identificación rápida y precisa de muestras biológicas. Esta técnica fue llamada "código de barras de ADN" (Hebert et al., 2003, 2004).

El barcoding se basa en la caracterización molecular de un fragmento del gen mitocondrial COI (Banerjee et al., 2015; Hebert et al., 2003; Torres Tola et al., 2020; Yang et al., 2020). La variación intraespecífica de dicho gen ha llevado a la necesidad de recurrir a regiones alternativas como la región de ADN ribosomal 28S que presenta una baja variación entre especies (Pacheco da Silva et al., 2017).

El barcoding es un fragmento estándar que permite identificar especies (Kang et al., 2017) y constituye una herramienta popular en estudios de filogenia molecular y evolución (Kang et al., 2017). Se basa en una secuencia estandarizada corta que facilita la identificación de individuos de una especie dado que la variación genética con otras especies rebasa la variación dentro de una misma especie (Hajibabaei et al., 2007).

El código de barras de ADN secuencia un fragmento corto de un gen proveniente de un espécimen desconocido para poder ser comparados con ayuda de una biblioteca de referencia de

códigos de barras de especies ya identificadas (Austerlitz et al., 2009). Se puede decir que utiliza un marcador genético corto para identificar una especie (Jalali et al., 2015). Esta herramienta permite estimar y dar seguimiento a la biodiversidad sobre todo en la filogenética comunitaria que ahonda en los procesos ecológicos y evolutivos que definen una estructura comunitaria (Heckenhauer et al., 2017).

El barcoding tiene como base el uso de una región estándar de ADN que funcione para una identificación rápida y precisa de las especies, dicho de otro modo, facilita la identificación de taxones a partir de una región de ADN estandarizada (Valentini et al., 2009).

Partiendo de la hipótesis de que el código de barras de ADN para cada especie es único, se toman en cuenta la combinación de las bases nitrogenadas respecto a las especies no identificadas y se plantea que la variación entre individuos de la misma especie es menor en comparación con otras especies (Frézal & Leblois, 2008).

En un inicio se instauró como una herramienta estándar para identificar animales de manera precisa (Frézal & Leblois, 2008) y buscaba ubicar a desconocidos dentro de una especie e identificar organismos microscópicos de morfología inaccesible (Frézal & Leblois, 2008). Al momento, ya se ha tenido resultados en la identificación de organismos extraídos del estómago de animales salvajes (Frézal & Leblois, 2008), en la revelación de linajes evolutivos de anfibios (Mcleod et al., 2011) y comunidades de artrópodos (Pentinsaari et al., 2020).

La técnica de identificación de especies a través del código de barras de ADN se ha convertido en una herramienta importante para resolver incertidumbres taxonómicas (Antil et al., 2023; Ferri et al., 2009; Liu et al., 2017; Lopez-Vaamonde et al., 2021) y ha llamado la atención por su capacidad en proporcionar una plataforma común a investigadores siendo de gran utilidad en los estudios sistemáticos y taxonómicos de insectos vectores de enfermedades (Banerjee et al., 2015).

El objetivo de esta técnica es ubicar individuos dentro de una determinada especie en función de la secuencia de un locus definido (Austerlitz et al., 2009). Se dice también que agrupa la taxonomía, la

filogenética molecular y la genética de poblaciones (Frézal & Leblois, 2008). La eficacia de esta técnica para la identificación de especímenes ha llevado al desarrollo de programa de investigación denominado Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) cuyo propósito fue desarrollar códigos de barras de ADN que se conviertan en un estándar global para la identificación de especies (Pando, 2014). Como resultado se ha generado una biblioteca de referencia de códigos de barras para más de 283 mil especies que residen en el barcoding del sistema de datos de vida (BOLD) (Zenteno Guillermo, 2019).

Algunas de las ventajas que se pueden resaltar del barcoding son la rápida accesibilidad a datos moleculares en contraste con los morfológicos, la identificación cuando por falta de datos no se pueden emparejar especímenes en diferentes fases de su ciclo de vida o su aplicabilidad en casos donde la morfología no permite distinguir claramente entre dos o más especies (Besansky et al., 2003; Frézal & Leblois, 2008).

Se ha sugerido también que utilizar árboles basados en el código de barras de ADN podría resultar más fiable sobre otros que utilizan un enfoque filomático. Además, permite incluir a individuos que no han logrado ser identificar posiblemente por la utilización de árboles filogenéticos no resueltos (Heckenhauer et al., 2017).

Especies que se han separado recientemente podrían ser difíciles de identificar incluso con ADN barcoding puesto que pueden compartir sitios polimórficos provenientes de especies ancestrales y que tomara tiempo que se fijen y originen mutaciones específicas en cada especie (Austerlitz et al., 2009).

Para construir un sistema de soporte de identificación automatizado para iniciativas de códigos de barras de ADN, es necesario acumular registros completos de códigos de barras de ADN para todos los organismos. Si se toma como referencia el gen mitocondrial COI, el número de mutaciones que diferencian a dos individuos para este locus COI incrementa a medida que pasa su tiempo de coalescencia, pero al no ser este locus el que cause los eventos de especiación no puede presenciarse un cambio claro frente a otras especies (Austerlitz et al., 2009).

Esta técnica ya ha sido aplicada en estudios previos donde se han obtenido datos de códigos de barras de ADN para especies diferentes de moscas de la familia Tabanidae (Davis, 2019; Krčmar et al., 2022; Nitiyamatawat et al., 2017; Votýpka et al., 2019) que buscan ser la base para facilitar la identificación rápida y precisa de estas especies de la familia (Banerjee et al., 2015; Changbunjong et al., 2020).

### **Gen 28S en filogenia**

Los organismos se podrían considerar resultado de una progresión evolutiva estocástica (Rouzine et al., 2001) lo que obliga a conocer su historia y relaciones con otros organismos para definirlo biológicamente (Olsen & Woese, 1993).

Para los estudios con insectos, la filogenia de los insectos se considera un apoyo a cambios macroevolutivos a nivel de evolución de vuelo o especializaciones morfológicas (Sharma, 2019). Pese al desarrollo de la sistemática molecular ha sido complicado alcanzar una filogenia estable (Ishiwata et al., 2011; Kjer et al., 2006; Sharma, 2019) principalmente por el tamaño del conjunto de datos, información de loci disponible o muestreo taxonómico (Sharma, 2019).

Un análisis molecular filogenético consiste en la filogenia de una parte del genoma (Olsen & Woese, 1993). Con frecuencia, se utilizan los genes y regiones del ADN ribosomal para análisis filogenéticos (Hassler et al., 2022; Hillis & Dixon, 1991; Olsen & Woese, 1993) y, las zonas con menor evolución se han convertido en herramientas clave para los linajes más antiguos dentro de los clados (Wiegmann et al., 2000).

La morfología en los análisis filogenéticos presenta numerosos inconvenientes al momento de la identificación y codificación de caracteres homólogos (Wiley & Lieberman, 2011) de modo que, cuando los caracteres se consideran incorrectamente homólogos el resultado es sesgo por parte de los investigadores (Callender-Crowe, 2020).

Estos análisis filogenéticos se basan cada vez más en caracteres procedentes de secuencias de ADN (Borkent, 2018), sin embargo, se recomienda trabajar cautelosamente hasta corroborar que puedan predecir filogenias (Borkent, 2018). La filogenética permite situar las observaciones en un contexto histórico buscando descifrar el origen de las especies (Wiley & Lieberman, 2011).

La diversidad del orden Diptera lo vuelve un candidato importante para análisis filogenéticos (Borkent, 2018) además, de que las fases de huevo, larva, pupa y adulto presentan divergencia morfológica (Borkent, 2018). El gen 28S se ha utilizado como un marcador molecular de importancia que se encuentra en el ADN ribosomal y que debido a su alta conservación es útil para inferir relaciones evolutivas entre especies y grupos taxonómicos (Jovelin & Justine, 2001; Mollaret et al., 1997; Vonnemann et al., 2005; Zardoya & Meyer, 1996), incluyendo Tabanidae (Dyer et al., 2008; Wiegmann et al., 2000).

Se ha realizado la secuenciación de fragmentos de ADN ribosomal 28S comprobando la clasificación taxonómica de tres de las subfamilias nombradas por (Mackerras, 1954): *Tabaninae*, *Pangoniinae* y *Chrysopsinae* (Wiegmann et al., 2000, 2003). Según los resultados, la filogenética inferida por el gen 28S junto a los datos morfológicos refuerzan la monofilia de los braquiteranos y sus cuatro principales infraórdenes comprobando la relación con clasificaciones anteriores (Wiegmann et al., 2003). Por otro lado, la monofilia de los *Tabanomorpha* se basa en tres puntos: presencia de un cepillo sobre las antenas larvarias, cabeza larvaria retráctil y clípeo adulto convexo y bulboso (Wiegmann et al., 2000).

Otra investigación planteó la reconstrucción de las relaciones filogenéticas en la familia de *Tabanomorpha* basado en la secuencia de la subunidad grande 28S (figura 8) (Wiegmann et al., 2000) puesto que se consideraba que las relaciones dentro de los grupos estaban mal resueltas al utilizar características morfológicas (Wiegmann et al., 2000). Los datos moleculares obtenidos acerca de la

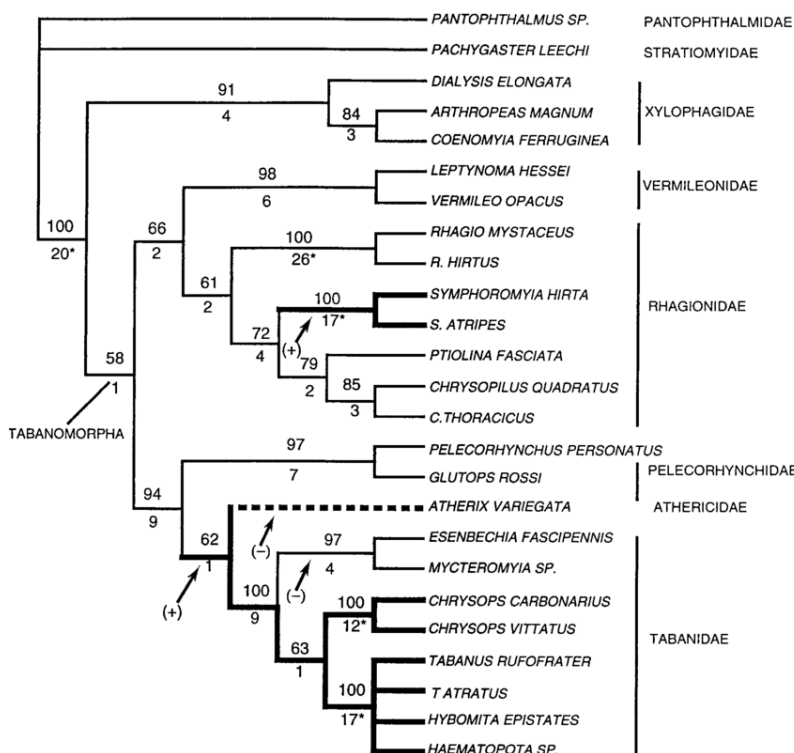
monofilia de los *Tabanomorpha* reforzaron la posición filogenética de los otros grupos y las relaciones entre los principales clados de tabanomorfos (Wiegmann et al., 2000).

Además de comprobar la distribución hipotética morfológica de tabanoideos (Wiegmann et al., 2000), los resultados apuntan a que la presencia de un primer segmento del cerco expandido ventrolateralmente y la condición retráctil de la cápsula craneal larvaria podría ser una sinapomorfía tabanomorfa (Wiegmann et al., 2000).

La importancia de estos estudios radica en que muchas de estas especies son vectores de enfermedades (Lucas et al., 2020) razón por la cual comprender su filogenia puede ser útil para desarrollar estrategias de control de enfermedades (Morita et al., 2016).

### Figura 8

Consenso de tres árboles parsimoniosos del ADN ribosómico 28S



*Nota.* Consenso estricto de tres árboles igualmente parsimoniosos del ADN ribosómico 28S. Tomado de: (Wiegmann et al., 2000).

A pesar de que están ampliamente distribuidas (Krolow & Henriques, 2023), la clasificación taxonómica con base filogenética en la familia Tabanidae ha sido limitada más, sin embargo, el estudio de Morita et al. (2016), considerado como uno de los estudios más ricos en datos sobre las especies de Tabanidae indica que el gen CAD1 es el más variable mientras que el 28S es el más conservado.



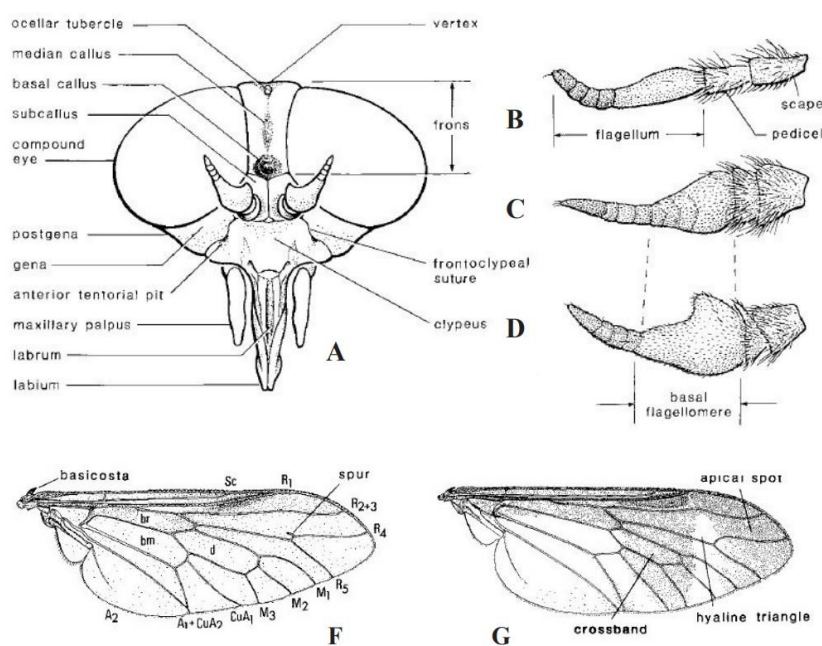
### Capítulo III: Materiales y métodos

#### Selección de especímenes de la familia Tabanidae a partir de su morfología.

El material que se utilizó se obtuvo de varias fuentes incluyendo la recolección realizada durante proyectos de vinculación y de fincas de colaboradores en la provincia de Pichincha que fueron conservadas en etanol absoluto. La identificación de las moscas pertenecientes a Tabanidae se realizó con ayuda de un estereomicroscopio y se comparó con los caracteres más distintivos utilizando claves dicotómicas descriptivas basados en sus alas, forma de cabeza y abdomen (figura 9).

#### Figura 9

##### Características morfológicas de la familia Tabanidae



*Nota.* Características morfológicas de A. cabeza, B–D. antena y F–G. venación del ala de insectos de la familia Tabanidae. Tomado de: Falck, 2014.

- Cabeza grande y se describe como semicircular o semilunar (Service, 2012). En las hembras adultas los ojos están separados mientras que en los machos casi se tocan (Crooft et al., 2017).

- Antenas divididas en tres segmentos (Figura 9 B, C, D) (Axtell, 1976).
- Alas caracterizadas por ser anchas, claras o con varias manchas oscuras (Chvala et al., 1972), la venación se presenta en las ramas R4 y R5 (Axtell, 1976).
- Abdomen dorsoventralmente aplanado (Zhang, 2012).

### Protocolo de extracción de ADN

Se extrajo ADN de la mitad de la muestra, tomando como referencia un plano sagital.

Previamente se extrajo las muestras del etanol y se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel hasta por aproximadamente 10 minutos o hasta que se vea totalmente seco para evitar contaminación con químicos. Para la extracción se compararon dos protocolos para aislar ADN genómico de tejido animal utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® de Promega.

### Tabla 3

*Protocolos sometidos a pruebas para estandarizar la extracción de ADN utilizando kit.*

Protocolo	Reactivos
Tejido animal (hígado y cerebro de ratón)	Solución de lisis de núcleos, proteinasa K 30mg/ml, RNAsa
Tejido animal (Cola de ratón)	Solución de EDTA 0,5 M, solución de lisis de núcleos, proteinasa K 30mg/ml, RNAsa.

*Nota.* En la tabla se presentan los reactivos utilizados en cada uno de los protocolos sometidos a pruebas para estandarizar la extracción de ADN utilizando el kit Wizard® de Promega.

Siguiendo el protocolo para hígado y cerebro de ratón, se agregaron 600 µl de solución de lisis de núcleos a un tubo de centrífuga de 1.5 ml y se dejó enfriar en hielo. A continuación, se colocó el tejido y se procedió a moler utilizando un pistilo plástico. Una vez desintegrado el tejido, se llevó a incubación a 65°C por 30 minutos. En el caso del protocolo para cola de ratón, se agregaron 120 µl de la solución 0.5M de EDTA en un tubo de centrífuga de 1.5 ml que previamente se llenó con 6000 µl de

solución de lisis de núcleos y se dejó enfriar en hielo. En un nuevo tubo de centrifuga de 1.5 ml se colocó el tejido junto con 600  $\mu$ l de la solución previamente mencionada.

A partir de aquí, se realizaron los mismos pasos para ambos protocolos. Se colocaron 11,6  $\mu$ l de proteinasa K 30mg/ml y se llevó nuevamente a incubación con agitación por 3 horas a 55°C. Después de eso se agregaron 6  $\mu$ l de solución de RNAsa mezclando por inversión del tubo para luego incubar 30 min a 37°C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos, después se colocaron 200  $\mu$ l de solución de precipitación de proteínas realizando agitación en vórtex a alta velocidad durante 20 segundos para luego colocar el tubo en hielo durante 5 minutos.

Tras eso, se centrifugaron las muestras durante 4 minutos a 13000 g de modo que se pudo observar un gránulo blanco. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante, se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga limpio de 1.5 ml que contenía 600  $\mu$ l de isopropanol a 4°C y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces. Seguidamente se centrifugó durante 1 minuto a 16000 g para luego decantar el sobrenadante y desecharlo. Se añadieron 600  $\mu$ l de etanol al 70% a 4°C al mismo tubo, se invirtió varias veces y se volvió a centrifugar durante 1 minuto a 13000 g.

Se retiró el etanol con ayuda de una micropipeta teniendo cuidado de aspirar el sedimento de ADN y se dejó secar sobre papel absorbente limpio durante 10 a 15 minutos o hasta que se observó que todo el etanol se hubiese evaporado. Finalmente, se agregaron 100  $\mu$ l de solución de rehidratación de ADN incubando durante toda la noche a 4 °C. El ADN rehidratado se guardó a -20°C hasta su uso.

Se realizaron pruebas también utilizando cabeza, abdomen y patas de los 10 especímenes de *Tabanidae* estudiados.

### **Cuantificación de ADN**

Una vez extraído el ADN, se tomaron 2  $\mu$ l de ADN de cada muestra y se cuantificaron los ácidos nucleicos utilizando el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan SkyHigh. Los

resultados se analizaron en función de la pureza A260/A280, A260/A230, concentraciones de ADN ( $\mu\text{g/ml}$ ) y electroforesis.

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron tabulados en una base de datos en el programa Infostat donde las variables de estudio se resumieron con las medidas de tendencia central y de dispersión. Se estudiaron los datos que presentaron una distribución normal mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey utilizando intervalos de confianza de un 95%.

### **Optimización de PCR para el gen 28S**

Las PCR se realizaron en reacciones de 12.5  $\mu\text{L}$  utilizando HotStart DNA Polimerasa (abm), Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™) y ADN polimerasa Taq Precision™. Los primers utilizados fueron 28K y rc28F según la bibliografía de Lessard, 2013.

#### **Tabla 4**

*Primers utilizados para la amplificación del gen 28S.*

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>	<b>Longitud (pb)</b>
<b>28S</b>	28K	GAAGAGCCGACATCGAAG	18
	rc28F	GTGATTTCTGCCAGTGCTCTG	22

*Nota.* La tabla presenta los cebadores utilizados para la amplificación del gen 28S. Adaptado de: Lessard, 2013.

Los parámetros del ciclo fueron: paso de desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos, 33 ciclos de desnaturalización a 93°C durante 30s, hibridación a 60°C durante 1 minuto, elongación a 72 °C durante 1 min 30 segundos y una elongación final a 72 °C durante 5 min. Las condiciones de PCR optimizadas fueron: temperatura y tiempo de hibridación, cebadores y cloruro de magnesio donde en cada prueba se incluyó un control negativo con agua libre de nucleasas (Tabla 5).

**Tabla 5***Protocolo para la amplificación del gen 28S*

<b>Reactivos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Stock</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen (µL)</b>
<b>H2O</b>	µL	N/A	-	13,75
<b>Buffer</b>	X	5,00	1,00	5,00
<b>28K</b>	µM	10,00	0,50	1,25
<b>rc28F</b>	µM	10,00	0,50	1,25
<b>MgSO4</b>	mM	25,00	2,50	1,00
<b>dNTP</b>	mM	40,00	0,80	0,50
<b>Taq</b>	U/µL	5,00	1,5	0,25
<b>ADN</b>	ngr/ul	12,5	25,00	2,00
<b>Total</b>				25,00

*Nota.* Concentraciones y volúmenes originales utilizados para la preparación del Mastermix para la amplificación del gen 28S.

### **Electroforesis en gel**

Las reacciones de PCR de cada muestra fueron realizadas en un gel de agarosa al 1.5%, se añadió 1 µL del tampón de carga de gel BlueJuice™ (10X) a la solución. El gel se corrió a 110 V durante 50 minutos. El gel completo se vio utilizando el fotodocumentador y transiluminador UV, así como en el sistema de imágenes ChemiDoc MP.

### **Purificación de bandas para secuenciación**

Para la purificación de las bandas correspondientes al gen deseado, se utilizó el Sistema de limpieza de gel y PCR Wizard® SV de Promega siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. El primer paso realizado fue la disolución de la rebanada de gel para ello se tomaron tubos de microcentrífuga de 1.5 ml para cada banda y se pesaron. A continuación, se extrajo la banda de ADN utilizando un transiluminador UV y se colocó en cada uno de los tubos para volver a anotar su peso. Se añadieron 10

$\mu$ l de solución de unión a membrana por cada 10 mg de porción de gel, se llevó a vórtex y se incubaron a 55°C por 10 minutos, o hasta que el gel se disolviera por completo, invirtiendo el tubo varias veces cada 3 minutos y realizando leve agitación en vórtex a los 5 minutos.

Por otro lado, se insertó una minicolumna SV en cada tubo de recolección en la cual se transfirió el gel disuelto dejando reposar 1 minuto a temperatura ambiente. Posterior a eso, se centrifugaron a 16000 g durante 1 minuto. Se desechó el contenido del tubo de recolección y se reinsertó la minicolumna misma a la que se agregaron 700  $\mu$ l de solución de lavado de membrana. En el paso subsiguiente se centrifugaron a 16000 g durante 1 minuto desechando nuevamente el contenido del tubo de recolección. Se volvió a insertar la minicolumna en el tubo de recolección agregando esta vez 500  $\mu$ l de solución de lavado de membrana para posteriormente centrifugar a 16000 g durante 5 minutos.

Se vació el tubo de recolección para volver a centrifugar la columna durante 1 minuto. La etapa final fue la elución, misma que consistió en transferir la minicolumna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml nuevo. Sobre la columna se colocaron 25  $\mu$ l de agua libre de nucleasas dejando a temperatura ambiente durante 1 minuto para luego centrifugar a 16000 g por 1 minuto. Finalmente se repitió la elución con 15  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, se desechó la minicolumna y se almacenó el tubo de microcentrífuga a -20 °C. Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar por el método de Sanger.

#### **Alineamiento de la secuencia obtenida**

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación se depuraron las muestras para eliminar regiones de mala calidad utilizando el programa informático MEGA y se procedió a realizar el análisis con el método Neighbor-joining tree en el programa MEGA para inferir el árbol filogenético.

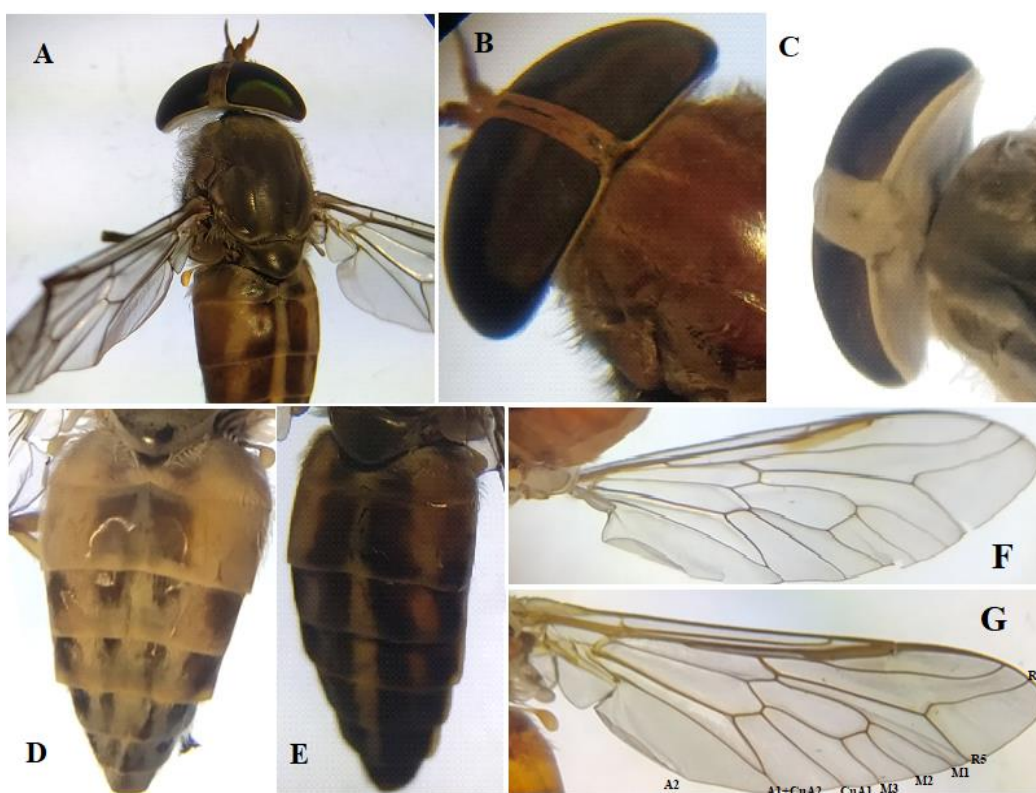
## Capítulo IV: Resultados

### Identificación morfológica de especímenes de la familia Tabanidae

Tomando en cuenta las características morfológicas descritas según bibliografía, del total de especímenes disponibles se identificaron un total de diez moscas pertenecientes a la familia Tabanidae (Figura 10).

#### Figura 10

*Moscas identificadas como familia Tabanidae*



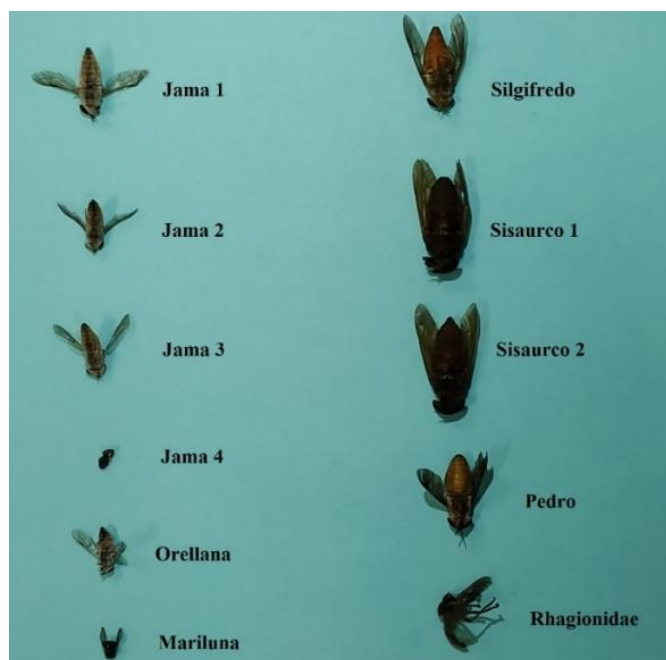
*Nota.* Características utilizadas para la identificación morfológica de moscas de la familia Tabanidae.

Cuerpo completo vista superior (A), cabeza vista superior (B) e inferior (C), abdomen vista dorsal (D) y ventral (E), ala vista superior (F) y por segmentos (G).

Teniendo en cuenta estas características, se relacionaron los insectos identificados con la zona geográfica de la que se obtuvieron (Figura 11).

**Figura 11**

*Muestras identificadas como familia Tabanidae junto al grupo excluyente (Rhagionidae)*



*Nota. Muestras identificadas como especímenes de la familia Tabanidae de los cuáles se realizó la extracción de ADN junto al grupo excluyente (Rhagionidae)*

### **Extracción de ADN**

Las pruebas realizadas para evaluar las variaciones a lo largo del protocolo se realizaron en especímenes del género *Rhagionidae* previo a la extracción en muestras de tábanos. La primera prueba fue utilizando el protocolo original para cada tipo de tejido (Tabla 6).

**Tabla 6**

*Cuantificación de la muestra de ADN obtenida al realizar el protocolo original*

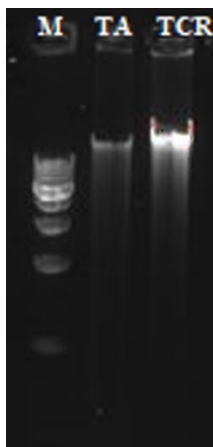
<b>Muestra</b>	<b>Protocolo</b>	<b>RNAsa</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Pureza A260/A230</b>	<b>Pureza A260/A280</b>	<b>ADN (ug/mL)</b>
<b>TA</b>	Tejido animal	3uL	30min	1,2246	0,483	46,22
<b>TCR</b>	Cola de ratón	3uL	30min	2,538	2,077	1339



*Nota.* Se presentan los resultados tras aplicar los protocolos originales establecidos por el kit para muestras provenientes de tejido animal.

### Figura 12

*Visualización en gel de agarosa de los protocolos de extracción comparados*



*Nota.* La figura muestra la integridad del ADN extraído con los protocolos originales comparados. TA corresponde al protocolo para tejido obtenido de hígado y cerebro de ratón y TCR corresponde al protocolo para tejido de cola de ratón.

Puesto que la cuantificación y el gel de agarosa reflejan un mejor resultado en cuanto a concentración de ADN utilizando el protocolo tejido cola de ratón (Figura 12), las siguientes pruebas fueron realizadas evaluando diferentes volúmenes de RNAsa así como tiempos de incubación. Se evaluó el uso de 2uL de RNAsa en un tiempo de incubación de 3 horas, dichas pruebas fueron realizadas por duplicados de manera que se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 7).

### Tabla 7

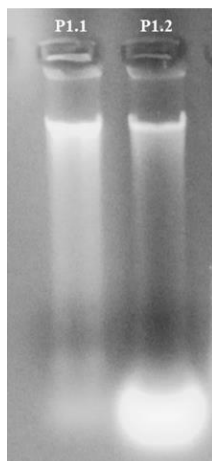
*Primer volumen y tiempo de incubación evaluados.*

Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN (ug/mL)
P1.1	2 uL	3h	1,214	0,2333	217,6
P1.2	2 uL	3h	1,828	1,019	941,2

*Nota.* Se presentan los resultados evaluando 2uL de RNAsa utilizando el tiempo de incubación de 3 horas en el ADN extraído con cada uno de los protocolos establecidos por el kit para muestras provenientes de tejido animal.

### Figura 13

*Primera prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón*



*Nota.* La figura muestra la integridad del ADN extraído evaluando 2uL de RNAsa utilizando el tiempo de incubación de 3 horas en el ADN extraído en muestras por duplicados.

Debido a la detección de ARN en la parte inferior junto con la degradación del material genético (Figura 13), se decidió aumentar la cantidad de RNAsa y reducir el tiempo de incubación (Tabla 8).

### Tabla 8

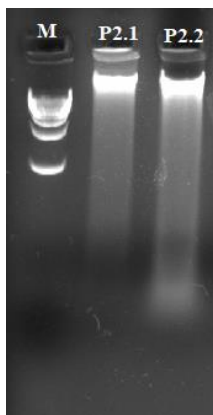
*Resultado de la cuantificación al evaluar la segunda concentración y tiempo de incubación de RNAsa utilizados.*

Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN (ug/mL)
P2.1	4 uL	1h	1,311	0,2589	58,06
P2.2	4 uL	1h	1,832	1,013	999,3

*Nota.* Se presentan los resultados evaluando 4uL de RNAsa utilizando el tiempo de incubación de 1 hora en cada uno de los protocolos establecidos por el kit para muestras provenientes de tejido animal.

#### Figura 14

*Segunda prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón*



*Nota.* Integridad del ADN extraído por duplicado evaluando 4uL de RNAsa incubado 1 hora.

En la siguiente prueba, se observó una disminución en la presencia de ADN al visualizar en el gel de agarosa (Figura 14), sin embargo, la cuantificación reflejó una reducción tanto en la cantidad de ADN como en la pureza A260/A280 que se vio reflejada en valores inferiores a 1.8 (Tabla 8).

La tercera prueba realizada fue utilizando 4uL de RNAsa en un tiempo de incubación de 30 minutos. Los resultados reflejaron un aumento en la concentración de ADN misma que se evidenció en la electroforesis (Figura 15), aunque los valores de la pureza A260/A280 y A260/A230 seguían inferiores a 1.8 (Tabla 9).

#### Tabla 9

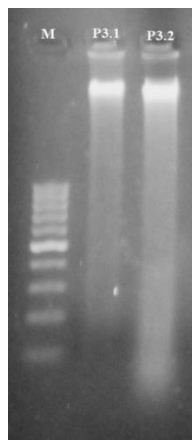
*Cuantificación de ADN después de la segunda concentración evaluada de RNAsa*

Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN (ug/mL)
P3.1	4 uL	30min	0,8906	0,1283	127
P3.2	4 uL	30min	1,682	0,7182	1010

*Nota.* Se presentan los resultados evaluando 4uL de RNAsa utilizando el tiempo de incubación de 30 minutos en cada uno de los protocolos establecidos por el kit para muestras provenientes de tejido animal.

### Figura 15

*Tercera prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón*



*Nota.* La figura muestra la integridad del ADN extraído por duplicados evaluando 4uL de RNAsa utilizando el tiempo de incubación de 30 minutos.

Conforme se evaluaron los diferentes volúmenes se observó la reducción de ARN, sin embargo, al realizar un análisis estadístico utilizando Infostat (Tabla 10) se determinó que el modelo presentó un p-valor de 0.017 reflejando que hubo una diferencia significativa al utilizar la RNAsa como un paso extra una vez finalizado el protocolo de extracción (Tabla 11).

### Tabla 10

*Tabla utilizada para el análisis estadístico*

Muestra	RNAsa (Enzima)	Tiempo (min)	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN ug/mL
P1.1	2	180	1,214	0,2333	217,6
P1.2	2	180	1,828	1,019	941,2
P2.1	4	60	1,311	0,2589	58,06
P2.2	4	60	1,832	1,013	999,3
P3.1	4	30	0,8906	0,1283	127

Muestra	RNAasa	Tiempo	Pureza	Pureza	ADN
	(Enzima)	(min)	A260/A230	A260/A280	ug/mL
P3.2	4	30	1,682	0,7182	1010

*Nota.* Se presentan la tabla resumen con los resultados de pureza A260/A230, pureza A260/A280 y concentración de ADN para las tres pruebas realizadas con el protocolo establecido por el kit para muestras provenientes de tejido animal de cola de ratón.

**Tabla 11**

*ANOVA de la concentración de ADN obtenida.*

F.V.	SC	gl	CM	p-valor
<b>Modelo</b>	1084766,08	3	361588,70	0,017
<b>RNAasa</b>	1265,67	1	1265,67	0,699
<b>Tiempo</b>	1585,63	1	1585,63	0,667
<b>Repetición</b>	1081914,78	1	1081914,78	0,0058
<b>RNAasa*Tiempo</b>	0	0	0	
<b>Error</b>	12694,57	2	6347,29	
<b>Total</b>	1097460,66	5		

*Nota.* Análisis de varianza de la concentración de ADN obtenida bajo los volúmenes de RNAasa y tiempos de incubación evaluados en el protocolo para tejido de cola de ratón. Se evidencia diferencia estadística significativa para el modelo utilizado.

Adicionalmente, la prueba de Tukey no reflejó diferencias significativas entre los grupos comparados al variar la concentración y tiempo de incubación de la RNAasa como un paso adicional fuera del protocolo (Tabla 12).

**Tabla 12**

*Prueba de Tukey para la interacción concentración de RNAasa y tiempo.*

RNAasa	Tiempo	Medias	
E3	T2	528,68	A
E3	T1	568,50	A
E2	T3	579,40	A

*Nota.* Prueba de Tukey; Alfa= 0.05 para la interacción concentración de RNAsa y tiempo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

Tras analizar dichos resultados, se decidió evaluar la incorporación de dicha enzima como un paso adicional dentro de ambos protocolos. Se encontró que al utilizar 6uL de RNAsa con un tiempo de incubación de 30 minutos en ambos protocolos, se presentaba la mayor concentración de ADN (Tabla 13). Sin embargo, al realizar la visualización en gel de agarosa, se vio una banda de mejores características utilizando el protocolo para tejido de cola de ratón (Figura 16).

**Tabla 13**

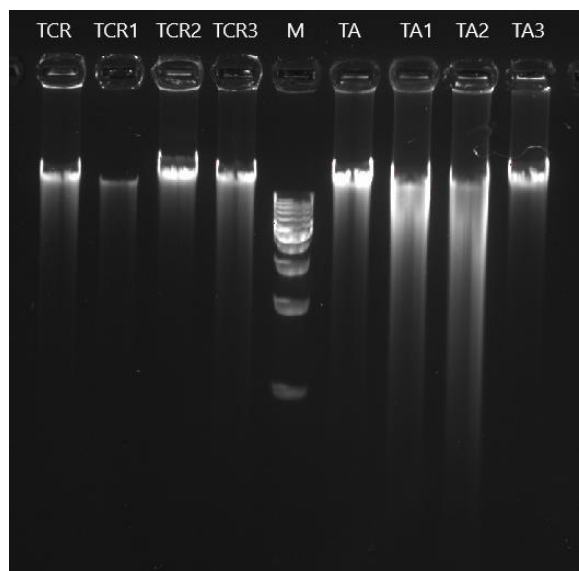
*Cuantificación del ADN obtenido al realizar modificaciones dentro del protocolo seleccionado*

Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza	Pureza	ADN ug/mL
			A260/A230	A260/A280	
TCR	3 uL	30 min	1,4022	0,754	167,6
TCR1	3 uL	1h	1,78	0,458	70,1
TCR2	6 uL	30 min	1,7552	1,774	881,4
TCR3	6 uL	1h	1,5477	0,688	91,73
TA	3 uL	30min	1,2246	0,483	46,22
TA1	3 uL	1h	1,5303	0,755	73,57
TA2	6 uL	30 min	1,3517	0,739	225,7
TA3	6 uL	1h	1,4976	0,883	371,1

*Nota.* Cuantificación de la muestra de ADN obtenida al realizar modificaciones utilizando 3 uL y 6 uL de RNAsa dentro del protocolo para tejido de cola de ratón.

**Figura 16.**

*Variaciones en los dos protocolos de extracción comparados*



*Nota.* La figura muestra la integridad del ADN extraído tras las variaciones en los dos protocolos comparados.

Se realizó el análisis estadístico correspondiente buscando determinar si había o no diferencia significativa entre dichas modificaciones (Tabla 14).

**Tabla 14**

*ANOVA de la concentración de ADN obtenida al comparar las variaciones en ambos protocolos.*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	288752,56	3	96250,85	0,35
<b>RNAsa</b>	183751,34	1	183751,34	0,17
<b>Tiempo</b>	63799,49	1	63799,49	0,38
<b>RNAsa*Tiempo</b>	41201,72	1	41201,72	0,47
<b>Error</b>	261367,62	4	65341,9	
<b>Total</b>	550120,17	7		

*Nota.* Análisis de varianza de la concentración de ADN bajo diferentes volúmenes de RNAsa y tiempos de incubación al comparar los protocolos para tejido animal proveniente de hígado y cerebro de ratón con el tejido de cola de ratón. El p-valor es mayor a 0.05 por lo tanto no hay diferencia significativa.

El análisis de varianza dio un p-valor de 0.35 lo cual no reflejó diferencias significativas entre las concentraciones de RNAsa utilizadas y tiempos de incubación (Tabla 14). De igual manera, la prueba de Tukey demostró que no se vio diferencias estadísticas significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 15).

**Tabla 15**

*Prueba de Tukey para la interacción entre la concentración de RNAsa utilizada y el tiempo de incubación.*

<b>RNAsa</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Medias</b>	
3uL	1h	71,84	A
3uL	30min	106,91	A
6uL	1h	231,42	A
6uL	30min	553,55	A

*Nota.* Prueba de Tukey; Alfa= 0.05 para la interacción entre la concentración de RNAsa utilizada y el tiempo de incubación. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

Al visualizar en el gel de agarosa se nota una evidente degradación al utilizar el protocolo para tejido animal (hígado y cerebro de ratón) por lo que se optó por trabajar con el protocolo para tejido de cola de ratón. Se optó por realizar pruebas con el protocolo establecido utilizando las diferentes secciones del cuerpo, de manera que se obtuvieron las siguientes cuantificaciones para abdomen, cabeza y patas (Tabla 16), mismas que fueron visualizadas en un gel de agarosa (Figura 17 y 18).

**Tabla 16**

*Cuantificación del ADN obtenido de diferentes secciones de los insectos.*

	<b>Muestra</b>	<b>Pureza A260/A230</b>	<b>Pureza A260/A280</b>	<b>ADN (ug/mL)</b>
<b>Abdomen</b>	1	1.82	1.70	467.80
	2	1.79	1.55	89.49
	3	1.81	1.43	203.80
<b>Cabez</b>	1	1.61	0.78	18.06
	2	2.06	1.40	17.24

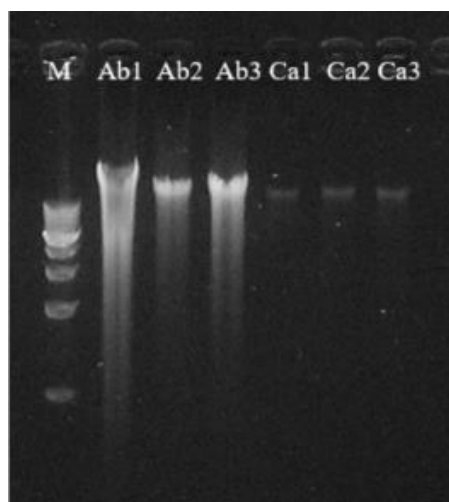


Muestra	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN (ug/mL)
3	1.96	1.31	22.24
Patas	1	0.24	16.94
	2	2.45	10.00
	3	1.31	28.27
	4	0.67	18.06

*Nota.* La tabla presenta la concentración de ADN de las diferentes secciones de cuerpo de los insectos utilizados.

### Figura 17.

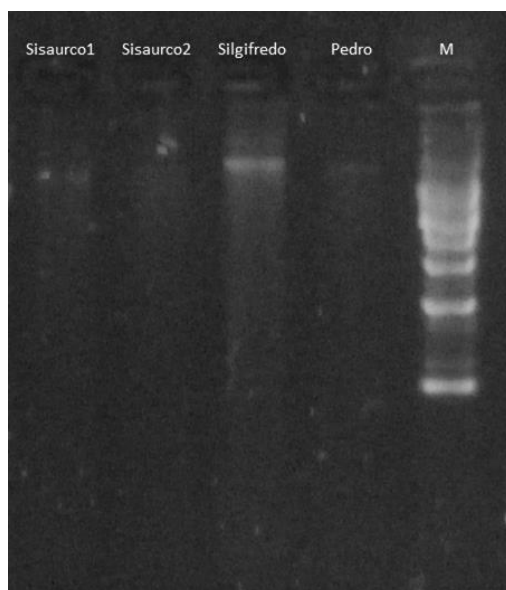
*ADN extraído de diferentes secciones del cuerpo*



*Nota.* ADN extraído a partir de abdomen y cabeza de insectos identificados como Tabanidae. Las muestras Ab corresponde a extracciones a partir del abdomen y Ca corresponde a extracciones a partir de la cabeza.

### Figura 18.

*ADN extraído de patas de insectos identificados como Tabanidae*



*Nota.* ADN extraído a partir de patas de 4 especímenes identificados como Tabanidae.

Debido a las bajas concentraciones de ADN reflejadas en las cuantificaciones de ADN realizadas, se decidió utilizar el cuerpo completo de los insectos disponibles. Esta elección tuvo como objetivo aumentar la concentración de ADN obtenida, de manera que resulte adecuada para llevar a cabo las subsiguientes pruebas de manera efectiva.

Se procedió a extraer el ADN de los 10 insectos identificados morfológicamente como Tabanidae para realizar la cuantificación respectiva de cada muestra (Tabla 17). Se visualizó el material genético extraído de los insectos junto con el grupo excluyente (Figura 19).

**Tabla 17**

*Cuantificación del ADN obtenido de los especímenes identificados como Tabanidae*

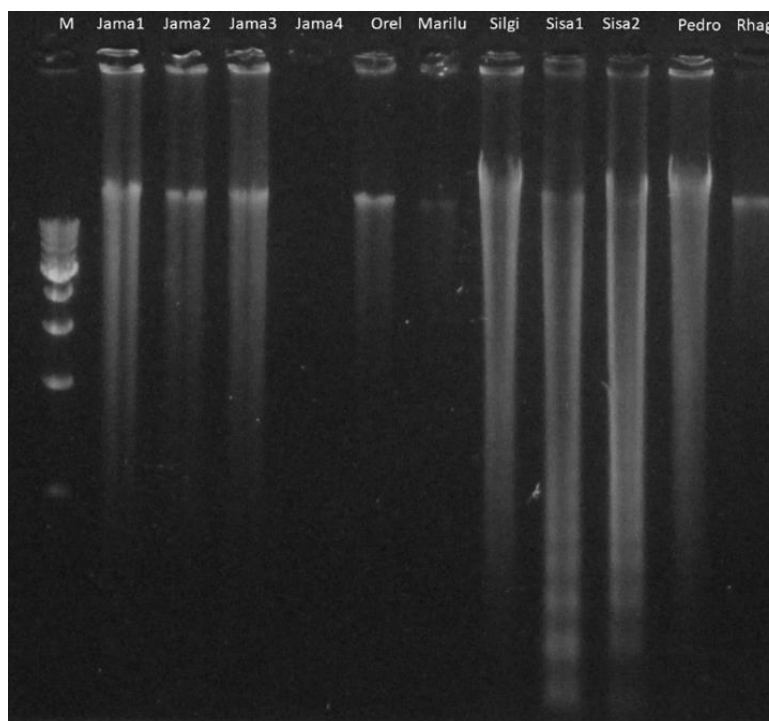
<b>Muestra</b>	<b>Pureza A260/A230</b>	<b>Pureza A260/A280</b>	<b>ADN ug/mL</b>
<b>Jama 1</b>	1.78	1.08	315
<b>Jama 2</b>	1.90	1.44	278
<b>Jama 3</b>	1.85	1.51	426.40
<b>Jama 4</b>	1.51	0.15	7.86
<b>Orellana</b>	1.88	1.24	188.80
<b>Mariluna</b>	1.90	1.05	94.29

Muestra	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN ug/mL
Silgifredo	1.83	1.11	1575
Sisaurco 1	1.82	1.42	1497
Sisaurco 2	1.80	1.38	1754
Pedro	1.85	1.05	1433
Rhagionidae	1.91	1.11	73.57

*Nota.* La tabla presenta un resumen de los diferentes parámetros de los resultados obtenidos para la extracción de los 10 insectos identificados morfológicamente como Tabanidae.

### Figura 19

*ADN extraído de especímenes de la familia Tabanidae junto al grupo excluyente*



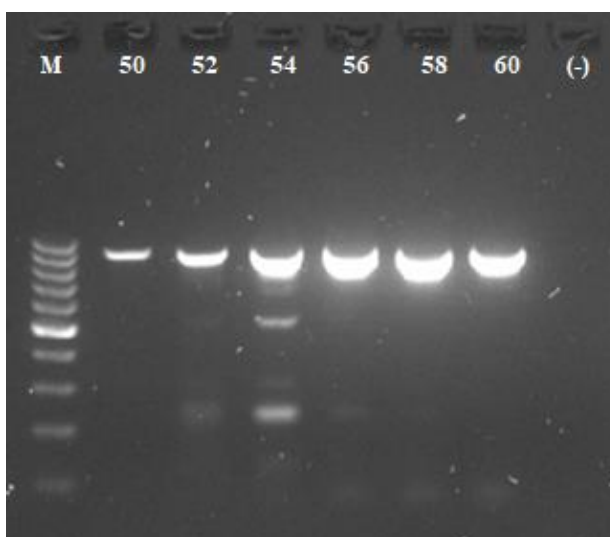
*Nota.* La figura refleja la integridad del ADN extraído utilizando el protocolo de extracción optimizado con el kit Wizard de Promega para los 10 insectos identificados como Tabanidae.

### Amplificación del gen 28S en especímenes de la familia Tabanidae

Después de llevar a cabo la primera prueba realizando un gradiente de temperatura desde 50°C hasta 60°C con intervalos de 2°C (Figura 20), se definió que la temperatura adecuada para trabajar era 60°C, esta elección se dio en función de la ausencia de bandas inespecíficas y la presencia de una banda significativa en dicho punto de temperatura.

#### Figura 20

*Gradiente de temperatura evaluado para la amplificación del gen 28S*

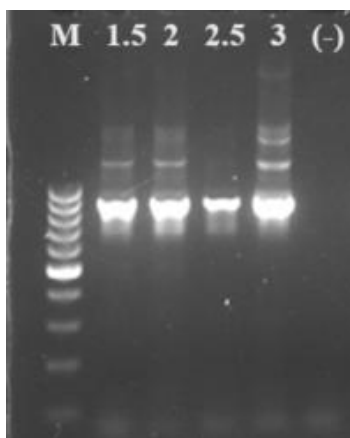


*Nota.* Amplicones del gen 28S al evaluar el gradiente de temperatura. (M) es el marcador estándar de peso molecular, (50:60) gradiente de temperaturas evaluadas y (-) control negativo.

A continuación, se visualizó el resultado del gradiente de la concentración final de cloruro de magnesio utilizado utilizando la temperatura de 60°C a partir de la cual se decidió seguir trabajando con la concentración de 2,5mM al ser la concentración óptima pues resultó en una menor degradación de la banda (Figura 21).

#### Figura 21

*Gradiente de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) evaluado en el protocolo de PCR*

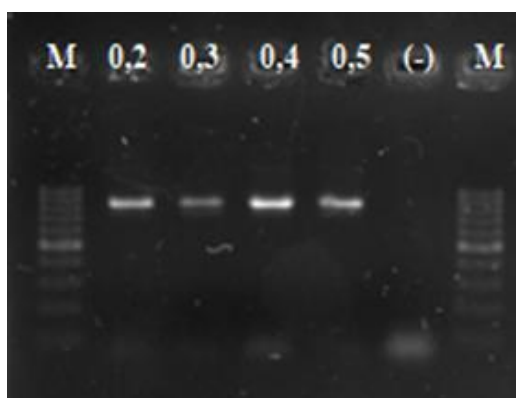


*Nota.* Amplicones del gen 28S al evaluar el gradiente de concentración de cloruro de magnesio utilizado (mM). (M) es el marcador estándar de peso molecular, (1.5:3) gradiente de cloruro de magnesio y (-) control negativo.

Una vez estandarizada la temperatura y concentración de cloruro de magnesio para trabajar, al evaluar las concentraciones de primer a utilizar se concluyó que la concentración óptima era de 0.4  $\mu$ M (Figura 22). Esta concentración se caracterizó por mostrar una banda prominente, sin la presencia de bandas inespecíficas adicionales.

### Figura 22

*Gradiente de la concentración de primers utilizado*

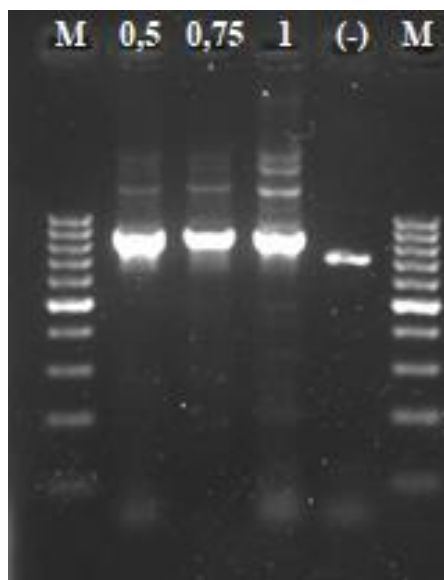


*Nota.* Amplicones del gen 28S al evaluar el gradiente de concentración de primer utilizado ( $\mu$ M). (M) es el marcador estándar de peso molecular, (0.2:0.5) concentraciones evaluadas y (-) control negativo.

El último reactivo en evaluar fue la ADN polimerasa que en el protocolo original se utilizaba en una concentración de 1U se decidió utilizar en una concentración de 0,5U puesto que la banda resultante no se vio alterada en comparación con concentraciones mayores (Figura 23).

### Figura 23

*Gradiente de ADN polimerasa evaluada para la amplificación del gen 28S*



*Nota.* Amplicones del gen 28S al evaluar el gradiente de ADN polimerasa utilizada (U/ $\mu$ L). (M) es el marcador estándar de peso molecular, (0.5:1) gradiente de ADN polimerasa evaluada y (-) control negativo.

De esta manera, la optimización quedó definida con las siguientes concentraciones utilizando la ADN polimerasa Precision™ Taq (Tabla 18).

### Tabla 18

*Protocolo optimizado para la amplificación del gen 28S en especímenes pertenecientes a la familia*

*Tabanidae*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen ( $\mu$ L)
H2O	$\mu$ L	N/A		13,75

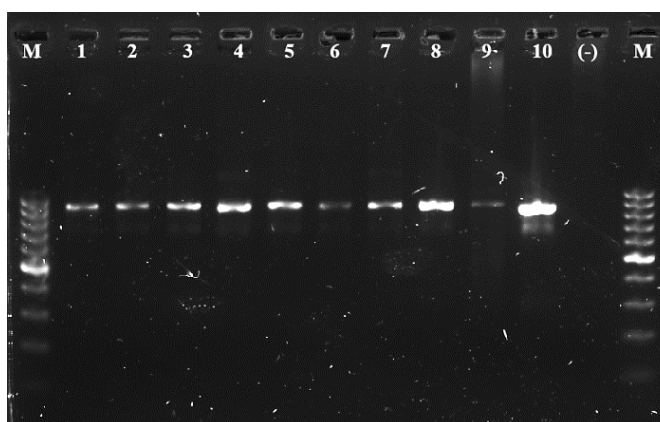
Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer	X	5,00	1,00	5,00
28K	$\mu$ M	10,00	0,40	1,25
rc28F	$\mu$ M	10,00	0,40	1,25
MgSO4	mM	25,00	2,50	1,00
dNTP	mM	40,00	0,80	0,50
Taq	U/ $\mu$ L	5,00	0,5	0,25
ADN	ngr/ $\mu$ l	12,5	25,00	2,00
<b>Total</b>				25,00

*Nota.* Concentraciones optimizadas para la preparación del Mastermix para la amplificación del gen 28S.

Se amplificó el gen 28S de las diez muestras identificadas como especímenes de la familia Tabanidae cuyo amplicón fue de aproximadamente 869 pb (Figura 24), debido a la calidad de las bandas visualizadas se seleccionaron todas las muestras para su respectiva secuenciación.

#### Figura 24

*PCR para la amplificación del gen 28S en especímenes de la familia Tabanidae*



*Nota.* Amplicones del gen 28S al evaluar el protocolo optimizada para la amplificación del gen 28S. (M) es el marcador estándar de peso molecular, (1:10) especímenes de las cuales se extrajo el ADN siguiendo el orden de la Figura 17 y (-) control negativo.

## Análisis filogenético

Las secuencias utilizadas fueron obtenidas a partir de bibliografía que corresponda con los especímenes identificados como Tabanidae, a continuación, se presenta una tabla resumen de las secuencias (Tabla 19).

**Tabla 19**

*Lista de especímenes pertenecientes a la familia Tabanidae incluidos en este estudio.*

<b>Especímenes</b>	<b>Número de acceso</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<i>Tabanus rufroter</i>	AF238537.1	980
<i>Tabanus subsimilis</i>	DQ415541.1	2848
<i>Chrysops vittatus</i>	AF238522.1	374
<i>Hybomitra epistates</i>	AF238542.1	536
<i>Esenbeckia fascipennis</i>	AF238515.1	375
<i>Anzomyia pegasus</i>	KC592432.1	693
<i>Fidena nr. pallidula</i>	KC592514.1	736
<i>Fidena (Fidena) sp.</i>	KC592523.1	764
<i>Fidena rhinophora</i>	KC592470.1	721
<i>Scaptia jacksoniensis</i>	KC592520.1	724
<i>Mycteromyia sp.</i>	AF238540.1	829
<i>Tabanus atratus</i>	AF238568.1	784
<i>Tabanus striatus</i>	JX624229.1	523
<i>Chrysops carbonarius</i>	AF238538.1	959
<i>Scaptia auriflua</i>	KM243484.1	745
<i>Scione maculipennis</i>	KC592528.1	747
<i>Haematopota sp.</i>	AF238567.1	604
<i>Scione rufipes</i>	KC592442.1	672
<i>Spania sp.</i>	LC149451.1	2756
<i>Pityocera cervus</i>	KC592531.1	724
<i>Goniops chrysocoma</i>	KC592542.1	721
<b>voucher SIM1151</b>		



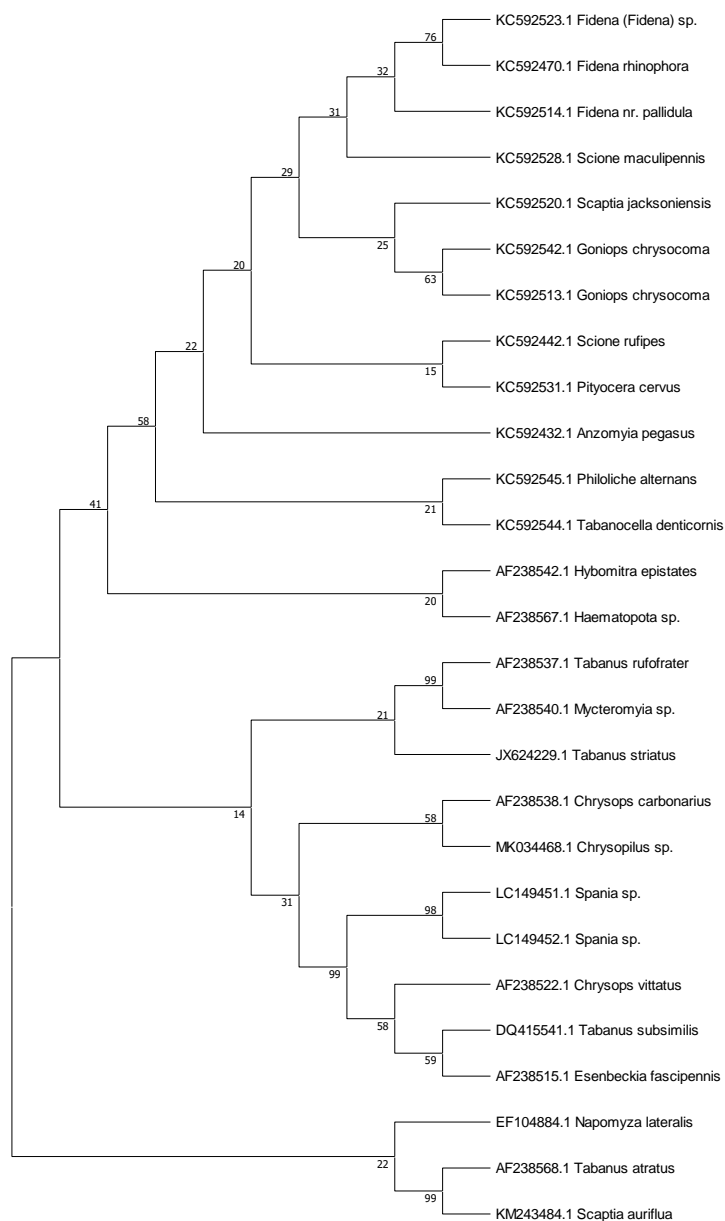
Especímenes	Número de acceso	Tamaño (pb)
<i>Goniops chrysocoma</i> voucher BDL130	KC592513.1	746
<i>Napomyza lateralis</i>	EF104884.1	1026
<i>Spania sp.</i>	LC149452.1	2750
<i>Chrysopilus sp.</i>	MK034468.1	420
<i>Philoliche alternans</i>	KC592545.1	750
<i>Tabanocella denticornis</i>	KC592544.1	744

*Nota.* Lista de los especímenes pertenecientes a la familia Tabanidae obtenidos de bases de datos incluidos en este estudio junto con su número de acceso y tamaño de la secuencia parcial.

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias comparadas se realizaron utilizando el método Neighbor-joining tree (Figura 25), el grupo externo utilizado fue *Napomyza lateralis* que presentaba similitud en cuanto a morfología con los especímenes que identificamos con el nombre de “*Rhagionidae*”.

## Figura 25

Árbol filogenético obtenido con el programa MEGA



*Nota.* Árbol filogenético inferido utilizando el método Neighbor-joining tree con secuencias del gen de ARN ribosomal 28S en especímenes de la familia Tabanidae.

El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap se muestra junto a las ramas.

## Capítulo VI: Discusión

### Extracción de ADN

El uso de la enzima RNAsa A facilita la eliminación del ARN del ADN genómico que se desea extraer al romper los enlaces entre la ribosa 5' de un nucleótido y el grupo fosfato que está unido a la ribosa 3' de un nucleótido de pirimidina cercano (Yoshinaga & Dalin, 2016). Se dice también que la RNAsa A es fundamental para aislar ADN genómico de calidad y, puede añadirse una vez completada la extracción de ADN; pese a que cada paso que se agrega utilizando RNAsa aporta calidad al ADN más sin embargo reduce el rendimiento general (Healey et al., 2014).

No basta con únicamente extraer el material genético de la fuente utilizada, se debe asegurar que el protocolo produzca rendimientos altos a la vez que se obtenga una pureza considerablemente buena (Karakousis et al., 2006). Para poder utilizar el ADN extraído en una investigación se requiere analizar los parámetros de pureza e integridad del ADN. La pureza, se relaciona con la absorbancia de manera que una relación 260/280 igual o aproximada a 1.8 suele considerarse pura (Boesenberg-Smith et al., 2012). Un dato importante a tener en cuenta es que, debido a que la absorbancia no discrimina entre el ADN y el ARN, la presencia de ARN puede hacer que la relación aumente. En cuanto a la relación 260/230, esta se utiliza como una medida secundaria que se sitúa entre 2 y 2.2, valores inferiores reflejan la presencia de contaminantes químicos (Lucena-Aguilar et al., 2016).

La tercera prueba realizada fue utilizando 4uL de RNAsa en un tiempo de incubación de 30 minutos (Tabla 8). Los resultados reflejaron un aumento en la concentración de ADN misma que se evidenció en la electroforesis (Figura 15), los valores de la pureza A260/A280 y A260/A230 seguían inferiores a 1.8 (Tabla 8) lo que reflejaría una posible contaminación con solventes orgánicos que tiene

una absorbancia cerca de los 230 nm como el EDTA que fue un reactivo utilizado en el primer paso de la extracción de ADN (Thermo Scientific, 2019).

Cabe mencionar también que la absorción de ADN depende del disolvente utilizado mismo que se ve reflejado en los resultados puesto que la pureza de estos resultados puede depender de la calidad de la solución de rehidratación de ADN provista por el kit que en este caso reemplazó al agua ultrapura libre de nucleasas del protocolo manual.

Por otro lado, al momento se han desarrollado ensayos dentro de la biología molecular que requieren el uso de un menor volumen de muestra lo que impide el uso de métodos convencionales para la cuantificación de ácidos nucleicos como la espectrofotometría UV tradicional (Shen, 2019). El sistema NanoDrop utiliza tecnología de fibra óptica en conjunto con las propiedades de tensión superficial de modo que se pueda retener dicho volumen, que generalmente es de 2 uL, lo que abre las puertas a estudios posteriores (Desjardins & Conklin, 2010).

### **Amplificación del gen 28S en especímenes de la familia Tabanidae**

La reacción en cadena de la polimerasa es una hermanita sensible que tras numerosas investigaciones, ha permitido identificar a numerosas especies incluyendo hongos (Karakousis et al., 2006), plantas (Wallinger et al., 2012) e insectos (Thongjued et al., 2019) incluyendo a los de la familia Tabanidae (Changbunjong et al., 2018).

Al momento ha sido evidenciado que la degradación del ADN puede generar repercusiones en la eficiencia de amplificación resultando en una codificación incorrecta del gen utilizado (Sikorsky et al., 2007). En la presente investigación se empleó la enzima termoestable DNA Polimerasa Precision™, la cual es capaz de replicar a temperaturas comprendidas entre 70 °C y 80 °C. Además, esta enzima presenta una actividad de exonucleasa que permite corregir posibles errores que puedan ocurrir durante la incorporación de nucleótidos (Applied Biological Materials Inc., 2016).

La fidelidad y eficacia de la PCR está ligada a la tasa de error que presenta la ADN polimerasa bajo las condiciones del protocolo empleado incluyendo pH, concentración de magnesio y concentración de nucleótidos (Agilent Technologies Inc, 2019), la tasa de error para la ADN polimerasa Precision™ Taq en PCR es de  $2,6 \times 10^{-6}$  por nucleótido por ciclo (Applied Biological Materials Inc., 2016).

### **Análisis filogenético**

La utilización del gen 28S como marcador molecular se basó en un estudio acerca de las relaciones filogenéticas dentro de la familia Tabanidae. Este estudio se apoyó en la amplificación del gen 28S, y otros genes como COI mitocondrial, CAD y AATS (Morita et al., 2016).

En 1987, se lanzó Neighbor-joining como un nuevo método para reconstruir árboles filogenéticos (Saitou & Nei, 1987), su principal objetivo fue identificar unidades taxonómicas operativas o "vecinos" que minimizaran la longitud total de las ramas en cada etapa del proceso de agrupamiento es decir, un método de construcción basado en la distancia (Evans et al., 2006).

Los especímenes que fueron identificados morfológicamente se cree que corresponden a *Tabanus rufofrater* y *Tabanus subsimilis* que, al observar en el árbol filogenético resultante, se encuentran dentro de un mismo cluster lo que refleja semejanza entre ambos, pero no están dentro de un mismo clado por lo que no se puede asegurar que compartan un ancestro común reciente.

## Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones

### Conclusiones

- El protocolo de extracción de ADN para tejido animal de cola de ratón es aplicable a insectos de la familia Tabanidae con una pureza A260/A230 de  $1.812 \pm 0.113$ , una pureza A260/A280 de  $1.143 \pm 0.391$  y una concentración promedio de ADN de  $756.93 \mu\text{g/mL}$ .
- El ADN extraído permitió la amplificación del marcador molecular 28S bajo los parámetros optimizados respecto a temperatura de hibridación, concentración de primers, concentración de magnesio y concentración de Taq polimerasa.
- El análisis filogenético demuestra que las especies, *Tabanus rufrofrater* y *Tabanus subsimilis*, morfológicamente similares a los especímenes son filogenéticamente semejantes y se encuentran distanciados de los grupos excluyentes demostrando así la posibilidad de utilizar el sistema de PCR Barcoding con el marcador molecular 28S.

### Recomendaciones

- Se recomienda utilizar muestras que hayan sido observadas y caracterizadas previamente utilizando el estereomicroscopio.
- Extraer ADN a partir de una sección del cuerpo del animal en caso de que se requieran investigaciones posteriores con las mismas muestras.
- Comprobar que el tiempo de secado de las muestras de ADN sobre el papel filtro sea adecuado para evitar contaminación con soluciones químicas

## Capítulo VI: Referencias

- Agilent Technologies Inc. (2019). *High-Fidelity PCR Enzymes: Properties and Error Rate Determinations*. Agilent Technologies, Inc.  
[https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/Technical%20Note\\_High-Fidelity%20PCR%20Enzymes\\_5994-0929EN\\_.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/Technical%20Note_High-Fidelity%20PCR%20Enzymes_5994-0929EN_.pdf)
- Antil, S., Abraham, J. S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, R., Sood, U., Lal, R., & Toteja, R. (2023). DNA barcoding, an effective tool for species identification: A review. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 761-775. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>
- Applied Biological Materials Inc. (2016). *Precision™ Taq DNA Polymerase*. abm™.  
[http://www.diamed.ca/pdf/Precision%20Taq%20DNA%20Polymerase%20\(G078\).pdf](http://www.diamed.ca/pdf/Precision%20Taq%20DNA%20Polymerase%20(G078).pdf)
- 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>
- Axtell, R. C. (1976). Coastal horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Marine insects*, 415.
- 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: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 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 Trópica*, 150, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.023>
- Banerjee, D., Maity, A., Naskar, A., & Homechoudhuri, S. (2017). *Taxonomic Accounts of Horse flies (Insecta: Diptera: Tabanidae) of West Bengal*.

- Barbet, J. L. (2014). Chapter 59—Ectoparasites of Horses. En D. C. Sellon & M. T. Long (Eds.), *Equine Infectious Diseases (Second Edition)* (pp. 495-504.e2). W.B. Saunders.  
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0891-8.00059-2>
- Berenger, J.-M., & Parola, P. (2017). 12—Arthropod Vectors of Medical Importance. En J. Cohen, W. G. Powderly, & S. M. Opal (Eds.), *Infectious Diseases (Fourth Edition)* (pp. 104-112.e1). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00012-5>
- Besansky, N. J., Severson, D. W., & Ferdig, M. T. (2003). DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: What you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology*, *19*(12), 545-546.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.015>
- Beutel, R. G., & Gorb, S. N. (2001). Diptera: West 1862. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.6279507>
- Birhanu, H. (2020). *Hematophagous Flies Species Diversity, Efficiency of Traps and Associated Protozoan Pathogens in Cattle in Arba Minch Zuria, Mirab Abaya and Kucha Districts of Gamo Zone* [Thesis]. <http://etd.aau.edu.et/handle/123456789/23053>
- Boesenberg-Smith, K. A., Pessaraki, M. M., & Wolk, D. M. (2012). Assessment of DNA Yield and Purity: An Overlooked Detail of PCR Troubleshooting. *Clinical Microbiology Newsletter*, *34*(1), 1-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2011.12.002>
- Boonsaen, P., Nevot, A., Onju, S., Fossaert, C., Chalermwong, P., Thaisungnoen, K., Lucas, A., Thévenon, S., Mameatathip, R., Jittapalapong, S., & Desquesnes, M. (2021). *Measures of The Direct Impact of Hematophagous Flies On Feeder Cattle: An Unexpectedly High Potential Economic Impact*.  
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-717630/v1>
- Borkent, A. (2018). The State of Phylogenetic Analysis: Narrow Visions and Simple Answers-Examples from the Diptera (flies). *Zootaxa*, *4374*(1), 107-143. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4374.1.7>
- Byford, R. L., Craig, M. E., & Crosby, B. L. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of Animal Science*, *70*(2), 597-602. <https://doi.org/10.2527/1992.702597x>



CABI. (2019). Tabanidae. *CABI Compendium*, *CABI Compendium*, 105617.

<https://doi.org/10.1079/cabicompendium.105617>

Callender-Crowe, L. (2020). *Comparing Morphology and Molecules to Evaluate Phylogenetic Inference*

[Doctorado, The University of Manchester].

<https://research.manchester.ac.uk/en/studentTheses/comparing-morphology-and-molecules-to-evaluate-phylogenetic-infer>

Cárdenas, R., Buestán, J., & Dangles, O. (2009). Diversity and distribution models of horse flies (Diptera: Tabanidae) from Ecuador. *Annales de la Société Entomologique de France*, *45*, 511-528.

<https://doi.org/10.1080/00379271.2009.10697633>

Carles-Tolra, M. (2015). Orden Diptera. *Ibero Diversidad Entomológica*, *63*, 1-22.

Caro, T., Argueta, Y., Briolat, E. S., Bruggink, J., Kasprowsky, M., Lake, J., Mitchell, M. J., Richardson, S., &

How, M. (2019). Benefits of zebra stripes: Behaviour of tabanid flies around zebras and horses.

*PLOS ONE*, *14*(2), e0210831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210831>

Carvajal López, V. (2020). Introducción al conocimiento de los Tabanidae de importancia médica del

Ecuador [Escuela Politécnica Nacional]. <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/20903>

Changbunjong, T., Bhusri, B., Sedwisai, P., Weluwanarak, T., Nitiyamatawat, E., Chareonviriyaphap, T., &

Ruangsittichai, J. (2018). Species identification of horse flies (Diptera: Tabanidae) in Thailand using DNA barcoding. *Veterinary Parasitology*, *259*, 35-43.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.07.002>

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), 974.

<https://doi.org/10.3390/insects12110974>

- Cheke, R. A., Mas, J., & Chainey, J. E. (2003). Potential vectors of loiasis and other tabanids on the island of Bioko, Equatorial Guinea. *Medical and Veterinary Entomology*, *17*(2), 221-223.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2003.00436.x>
- Chvala, M., Lyneborg, L., & Moucha, J. (1972). The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae). *The Horse Flies of Europe (Diptera, Tabanidae)*.  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19732205451>
- 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>
- 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)
- Derek Scasta, J., Engle, D. M., Talley, J. L., Weir, J. R., Fuhlendorf, S. D., & Debinski, D. M. (2015). Drought Influences Control of Parasitic Flies of Cattle on Pastures Managed with Patch-Burn Grazing. *Rangeland Ecology & Management*, *68*(3), 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.rama.2015.03.001>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, *45*, e2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Desquesnes, M., Thaisungnoen, K., Chalermwong, P., Nevot, A., Fossaert, C., Lucas, A., Onju, S., Boonsaen, P., & Jittapalapong, S. (2022). The Use of “Tail-Pedometers” to Evaluate the Impact of Dipterans in Feeder Cattle. *Insects*, *13*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/insects13070616>
- Evans, J., Sheneman, L., & Foster, J. (2006). Relaxed Neighbor Joining: A Fast Distance-Based Phylogenetic Tree Construction Method. *Journal of Molecular Evolution*, *62*(6), 785-792.  
<https://doi.org/10.1007/s00239-005-0176-2>

Facultad de Biología UCM. (2004). *Entomología Ambiental y Aplicada*. [Tabla]. Recuperado de:

<http://web.bioucm.es/cont/ea/sesiones.php?sesion=107&bloque=3>

Falck, M. (2014). *The Horse Flies (Diptera, Tabanidae) of Norway*. 61, 219-264.

Ferri, G., Alù, M., Corradini, B., Licata, M., & Beduschi, G. (2009). Species identification through DNA

«barcodes». *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(3), 421-426.

<https://doi.org/10.1089/gtmb.2008.0144>

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>

Foil, L. D., Meek, C. L., Adams, W. V., & Issel, C. J. (1983). Mechanical transmission of equine infectious

anemia virus by deer flies (*Chrysops flavidus*) and stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *American*

*Journal of Veterinary Research*, 44(1), 155-156.

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>

García Más, I., Muñoz Araújo, B., Aguirre Inchaurre, A., Polo Roldán, I., García Moreno, A., & Refoyo

Román, P. (2009). Manual de laboratorio de Parasitología. 12. Insectos Dípteros. *REDUCA*

*(Biología)*, 2(5), Article 5. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/807>

García Pincay, A. N. (2017). *Prevalencia de Trypanosoma spp y su efecto en la salud de bovinos del*

*cantón Daule, provincia del Guayas* [Pregrado, Universidad Agraria del Ecuador].

<https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/GARCIA%20PINCAY%20ANSELMO%20NICOLAS.pdf>

Guimarães, R. R., Júnior, H. R. S. R. and R. R. G., Guimarães, R. R., & Júnior, H. R. S. R. and R. R. G. (2017).

Tabanids in South America. En *Insect Physiology and Ecology*. IntechOpen.

<https://doi.org/10.5772/67108>

- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4), 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>
- Hassler, H. B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R. W., Russell, B. T., & Richards, V. P. (2022). Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. *Microbiome*, 10(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01295-y>
- Hawkins, J. A., Love, J. N., & Hidalgo, R. J. (1982). Mechanical transmission of anaplasmosis by tabanids (Diptera: Tabanidae). *American Journal of Veterinary Research*, 43(4), 732-734.
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., & Henry, R. J. (2014). Protocol: A simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10, 21. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl 1), S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2(10), e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Heckenhauer, J., Salim, K. A., Chase, M. W., Dexter, K. G., Pennington, R. T., Tan, S., Kaye, M. E., & Samuel, R. (2017). Plant DNA barcodes and assessment of phylogenetic community structure of a tropical mixed dipterocarp forest in Brunei Darussalam (Borneo). *PLOS ONE*, 12(10), e0185861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185861>
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), 411-453. <https://doi.org/10.1086/417338>

- Ishiwata, K., Sasaki, G., Ogawa, J., Miyata, T., & Su, Z.-H. (2011). Phylogenetic relationships among insect orders based on three nuclear protein-coding gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(2), 169-180. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.001>
- Jalali, S. K., Ojha, R., & Venkatesan, T. (2015). DNA Barcoding for Identification of Agriculturally Important Insects. En A. K. Chakravarthy (Ed.), *New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management* (pp. 13-23). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2089-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2089-3_2)
- Kang, Y., Deng, Z., Zang, R., & Long, W. (2017). DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13057-0>
- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., & Wormald, P. J. (2006). An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 65(1), 38-48. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.008>
- Kjer, K., Carle, F., Litman, J., & Ware, J. (2006). A Molecular Phylogeny of Hexapoda. *Arthropod Systematics and Phylogeny*, 64, 35-44.
- 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). Review Article1: 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>

- Lessard, B. (2013). *The taxonomy, systematics and biogeography of the austral horse fly tribe scionini (Diptera: Tabanidae)*. <https://doi.org/10.25911/5d514b0fb49df>
- Liu, J., Jiang, J., Song, S., Tornabene, L., Chabarria, R., Naylor, G. J. P., & Li, C. (2017). Multilocus DNA barcoding – Species Identification with Multilocus Data. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16920-2>
- Lopez-Vaamonde, C., Kirichenko, N., Cama, A., Doorenweerd, C., Godfray, H. C. J., Guiguet, A., Gomboc, S., Huemer, P., Landry, J.-F., Laštůvka, A., Laštůvka, Z., Lee, K. M., Lees, D. C., Mutanen, M., van Nieukerken, E. J., Segerer, A. H., Triberti, P., Wieser, C., & Rougerie, R. (2021). Evaluating DNA Barcoding for Species Identification and Discovery in European Gracillariid Moths. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.626752>
- Lucas, M., Krolow, T. K., Riet-Correa, F., Barros, A. T. M., Krüger, R. F., Saravia, A., & Miraballes, C. (2020). Diversity and seasonality of horse flies (Diptera: Tabanidae) in Uruguay. *Scientific Reports*, 10(1), 401. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57356-0>
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Mackerras, I. M. (1954). *The Classification and Distribution of Tabanidae (Diptera)*.
- McAlpine, J. F., Peterson, B. V., Shewell, G. E., Teskey, H. J., Vockeroth, J. R., & Wood, D. M. (1981). Manual of Nearctic Diptera. Volume 1. *Monograph Research Branch Agriculture Canada (Canada)*.
- Mcleod, D. S., Horner, S. J., Husted, C., Barley, A., & Iskandar, D. (2011). «Same-same, but different»: An unusual new species of the *Limnonectes kuhlii* Complex from West Sumatra (Anura: Dicroglossidae). *Zootaxa*, 2883(1), Article 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2883.1.4>

- Morita, S. I., Bayless, K. M., Yeates, D. K., & Wiegmann, B. M. (2016). Molecular phylogeny of the horse flies: A framework for renewing tabanid taxonomy. *Systematic Entomology*, 41(1), 56-72.  
<https://doi.org/10.1111/syen.12145>
- 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>
- Mullens, B. (2019). 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>
- Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: A key to phylogeny. *The FASEB Journal*, 7(1), 113-123. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.1.8422957>
- Pando, F. (2014). *La iniciativa «Barcode of Life» y las colecciones de historia natural*.  
[https://www.gbif.es/wp-content/uploads/2018/01/04\\_BOL\\_Col\\_FP.pdf](https://www.gbif.es/wp-content/uploads/2018/01/04_BOL_Col_FP.pdf)
- Pazmiño-Palomino, A., Andreocci, R., & Inclán, D. J. (2021). *Acanthocera buestani* a new species of rare wasp-like horsefly, with notes on the subgenus *Querbetia* from Ecuador. *Neotropical Biodiversity*, 7(1), 198-204. <https://doi.org/10.1080/23766808.2021.1938888>
- Pentinsaari, M., Blagoev, G. A., Hogg, I. D., Levesque-Beaudin, V., Perez, K., Sobel, C. N., Vandenbrink, B., & Borisenko, A. (2020). A DNA Barcoding Survey of an Arctic Arthropod Community: Implications for Future Monitoring. *Insects*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/insects11010046>
- Perich, M. J., Wright, R. E., & Lusby, K. S. (1986). Impact of Horse Flies (Diptera: Tabanidae) on Beef Cattle. *Journal of Economic Entomology*, 79(1), 128-131. <https://doi.org/10.1093/jee/79.1.128>
- Petersen, J. M., Mead, P. S., & Schriefer, M. E. (2009). *Francisella tularensis*: An arthropod-borne pathogen. *Veterinary Research*, 40(2), 07. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008045>

- Ricci, E. M., & Margaría, C. B. (2022). *Aparatos bucales de insectos*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/143456>
- Rouzine, I. M., Rodrigo, A., & Coffin, J. M. (2001). Transition between Stochastic Evolution and Deterministic Evolution in the Presence of Selection: General Theory and Application to Virology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 151-185.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.151-185.2001>
- 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>
- Salamanca-Carreño, A., Tamasaukas, R., Giraldo-Forero, J. C., Quintero, A. D., Hernandez, M. E., Salamanca-Carreño, A., Tamasaukas, R., Giraldo-Forero, J. C., Quintero, A. D., & Hernandez, M. E. (2020). Valoración de las relaciones de Rickettsia de *Anaplasma marginale* con factores agroecológicos y productivos en bovinos doble propósito en sabanas inundables del Arauca, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3).  
<https://doi.org/10.15381/rivep.v31i3.16134>
- Service, M. (2012). *Medical Entomology for Students* (5.<sup>a</sup> ed.). Cambridge University Press.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139002967>
- Sharma, P. P. (2019). Integrating morphology and phylogenomics supports a terrestrial origin of insect flight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(8), 2796-2798.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1822087116>
- Shen, C.-H. (2019). Chapter 7—Detection and Analysis of Nucleic Acids. En C.-H. Shen (Ed.), *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 167-185). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9>



- Sikorsky, J. A., Primerano, D. A., Fenger, T. W., & Denvir, J. (2007). DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(2), 431-437. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.169>
- Squitier, J. M. (2021). *Deer Flies, Yellow Flies and Horse Flies, Chrysops, Diachlorus, and Tabanus spp. (Insecta: Diptera: Tabanidae)*. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/IN155>
- Stark, H. (2017, agosto). Economic Losses, Buzz Off. *American Hereford Association*, 92.
- Taylor, D. B., Moon, R. D., & Mark, D. R. (2012). Economic impact of stable flies (Diptera: Muscidae) on dairy and beef cattle production [Tabla]. *Journal of Medical Entomology*, 49(1), 198-209. <https://doi.org/10.1603/me10050>
- Thermo Scientific. (2019). *260/280 and 260/230 Ratios*. [https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260\\_280-and-260\\_230-Ratios.pdf](https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf)
- Thongjued, K., Chotigeat, W., Bumrungsri, S., Thanakiatkrai, P., & Kitpipit, T. (2019). A new cost-effective and fast direct PCR protocol for insects based on PBS buffer. *Molecular Ecology Resources*, 19(3), 691-701. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13005>
- Tidwell, M. (1970). *Tabanidae (Diptera): Some Systematic Aspects*. *LSU Historical Dissertations and Theses*. [https://doi.org/10.31390/gradschool\\_disstheses.1813](https://doi.org/10.31390/gradschool_disstheses.1813)
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
- Villacide, J. M. (2012). *Los Tábanos* (M. Masciocchi, Ed.). <http://hdl.handle.net/20.500.12123/8177>
- Wallinger, C., Juen, A., Staudacher, K., Schallhart, N., Mitterrutzner, E., Steiner, E.-M., Thalinger, B., & Traugott, M. (2012). Rapid Plant Identification Using Species- and Group-Specific Primers Targeting Chloroplast DNA. *PLoS ONE*, 7(1), e29473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029473>

- Wiegmann, B. M., Tsaur, S.-C., Webb, D. W., Yeates, D. K., & Cassel, B. K. (2000). Monophyly and Relationships of the Tabanomorpha (Diptera: Brachycera) Based on 28S Ribosomal Gene Sequences. *Annals of the Entomological Society of America*, 93(5), 1031-1038.  
[https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2000\)093\[1031:MAROTT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2000)093[1031:MAROTT]2.0.CO;2)
- Wiegmann, B. M., Yeates, D. K., Thorne, J. L., & Kishino, H. (2003). Time Flies, a New Molecular Time-Scale for Brachyceran Fly Evolution Without a Clock. *Systematic Biology*, 52(6), 745-756.  
<https://doi.org/10.1093/sysbio/52.6.745>
- Wiley, E. O., & Lieberman, B. S. (2011). *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. John Wiley & Sons.
- Yoshinaga, Y., & Dalin, E. (2016). *RNase A Cleanup of DNA Samples*. Joint Genome Institute.  
[https://jgi.doe.gov/wp-content/uploads/2017/02/RNaseA\\_DNA\\_Cleanup.pdf](https://jgi.doe.gov/wp-content/uploads/2017/02/RNaseA_DNA_Cleanup.pdf)
- Zenteno Guillermo, N. J. (2019). Aplicación del código de barras de ADN en la identificación de insectos fitófagos asociados al cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en Perú. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10544>
- Zhang, J. (2012). New horseflies and water snipe-flies (Diptera: Tabanidae and Athericidae) from the Lower Cretaceous of China. *Cretaceous Research*, 36, 1-5.  
<https://doi.org/10.1016/j.cretres.2012.01.004>