



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



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

TRABAJO DE LA UNIDAD DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**“OPTIMIZACIÓN DE LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE INSECTOS DE LA FAMILIA TABANIDAE DEL
MARCADOR MOLECULAR 28S”**

Gaona Quinde Andrea Patricia

Directora: Martin Solano Sarah, Ph.D

31 de agosto del 2023





- Introducción
- Justificación del problema
- Objetivos e hipótesis
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

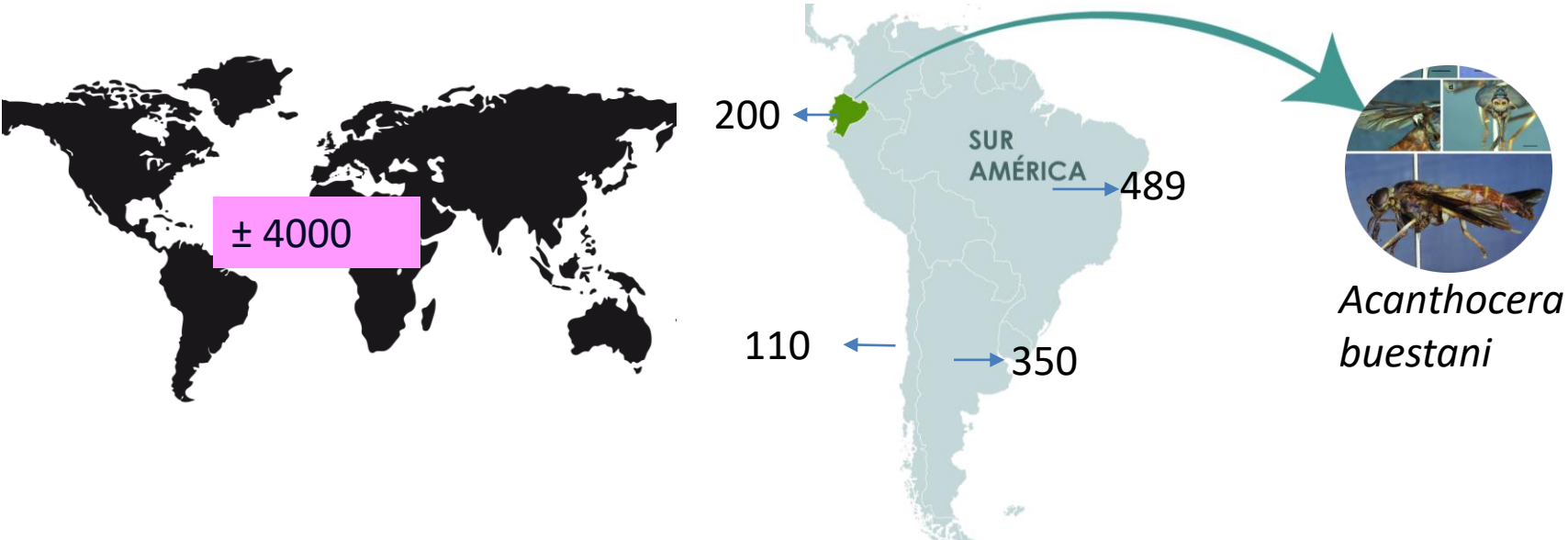


Figura 1. Distribución regional de moscas *Tabanidae*

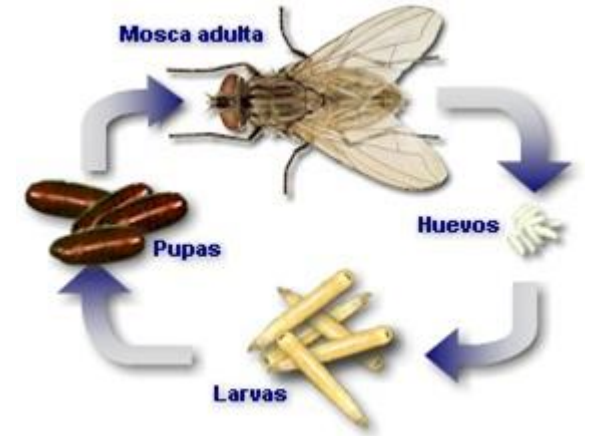


Figura 2. Ciclo de vida *Tabanidae*



L= 6-30mm

Robusta, pesada

Envergadura alar
65mm

Marrón oscuro

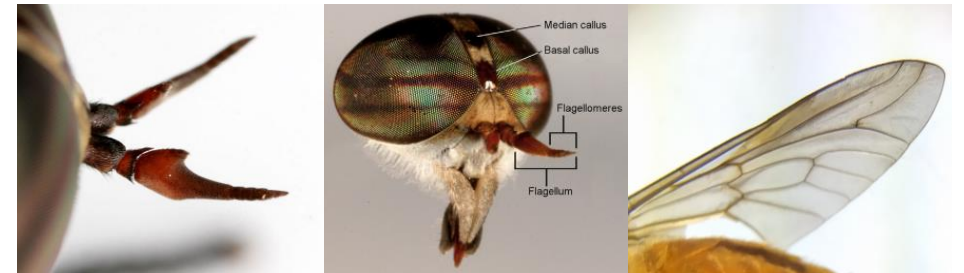
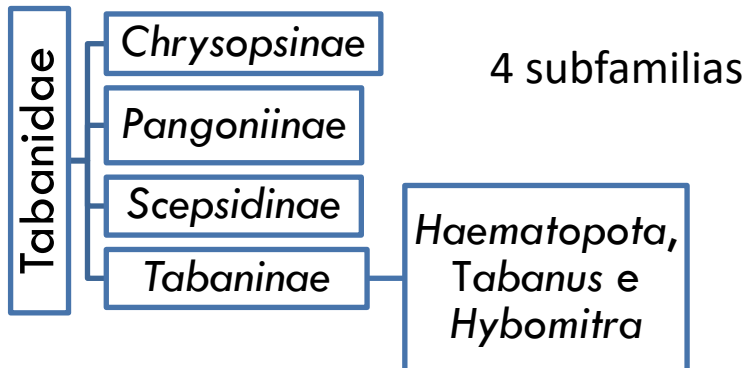


Figura 3. Morfología de moscas *Tabanidae*

Reino	Animalia
Phylum	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Brachycera
Superfamilia	Tabanomorpha
Familia	Tabanidae



4000 especies y subespecies



Anaplasmosis
Anemia infecciosa equina
Carbunco
Tripanosomiasis

2019

- Ganado
- Productos lácteos



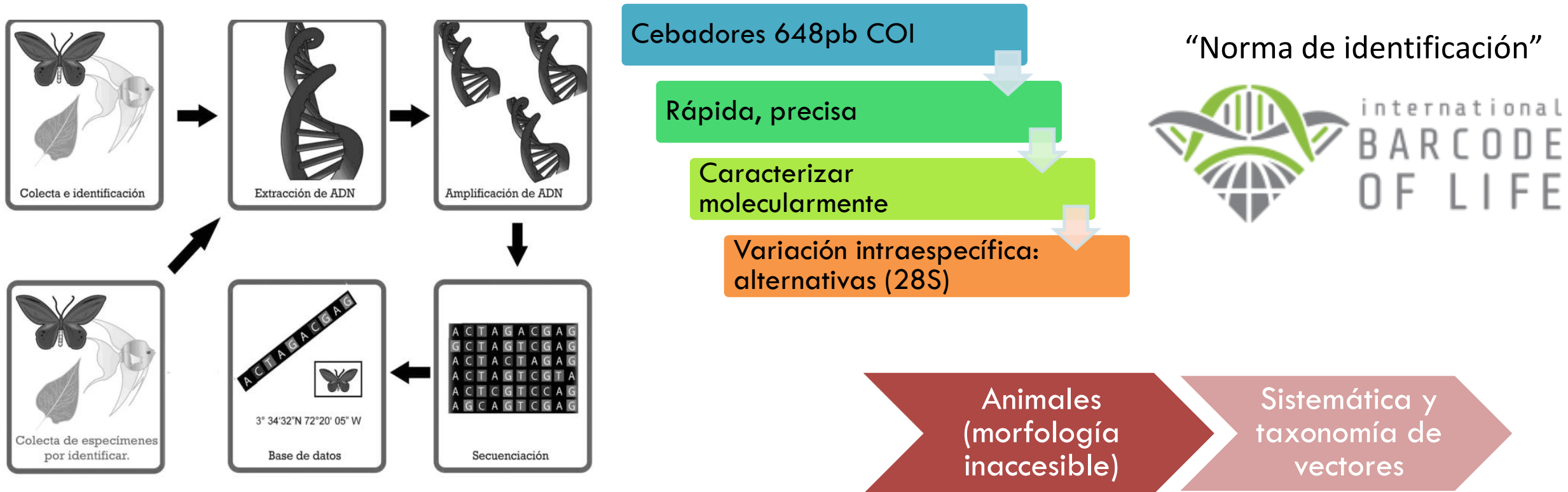
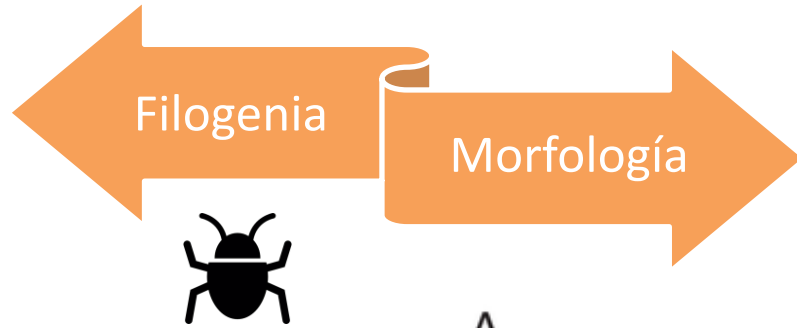


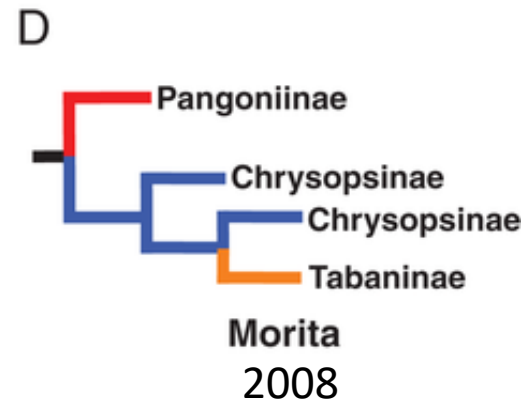
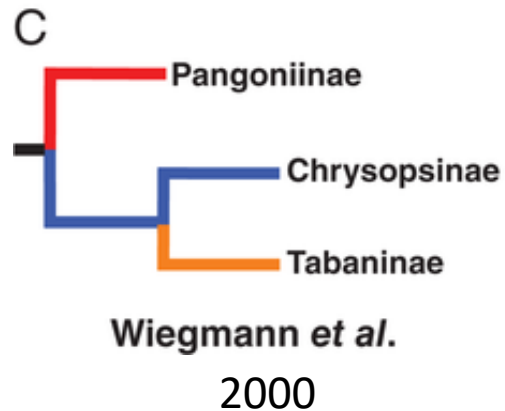
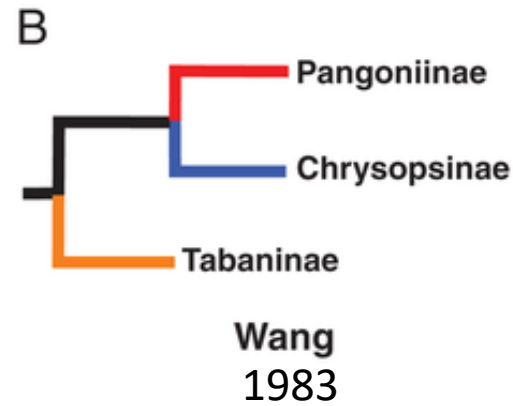
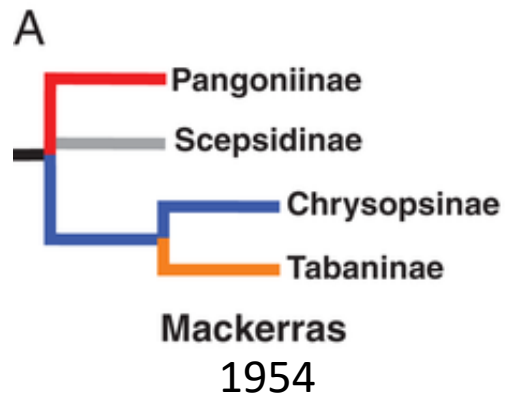
Figura 4. Procedimiento de laboratorio PCR barcoding

Ventajas

- Rápida accesibilidad a datos moleculares
- Identificación en diferentes fases
- Árboles más fiables



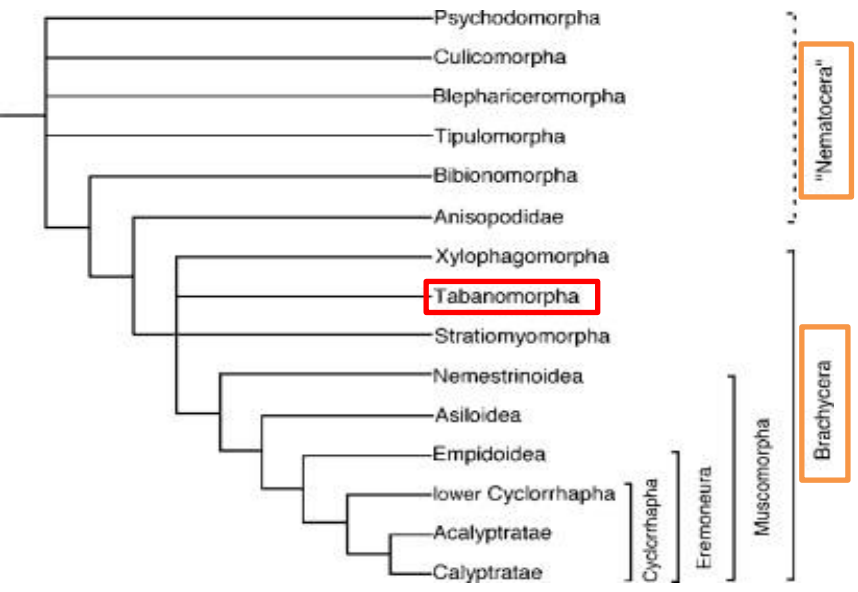
Filogenia de una parte
Seq. ADN ribosomal
Menor evolución, linaje antiguo



CAD1 variable

28S conservado

Figura 5. Hipótesis filogenéticas alternativas para relaciones de nivel superior de tábanos



Impacto

- Eficiencia alimenticia (ganado de carne)
- 1900 \$608M → 2012 \$2,211 M

Plaga difícil

- Repelentes
- Manipular los hábitats de las larvas
- Trampas permanentes

Identificación

- Morfología (errores)
- MÉTODOS MOLECULARES
- Rol en transmisión
- Estrategias control/manejo

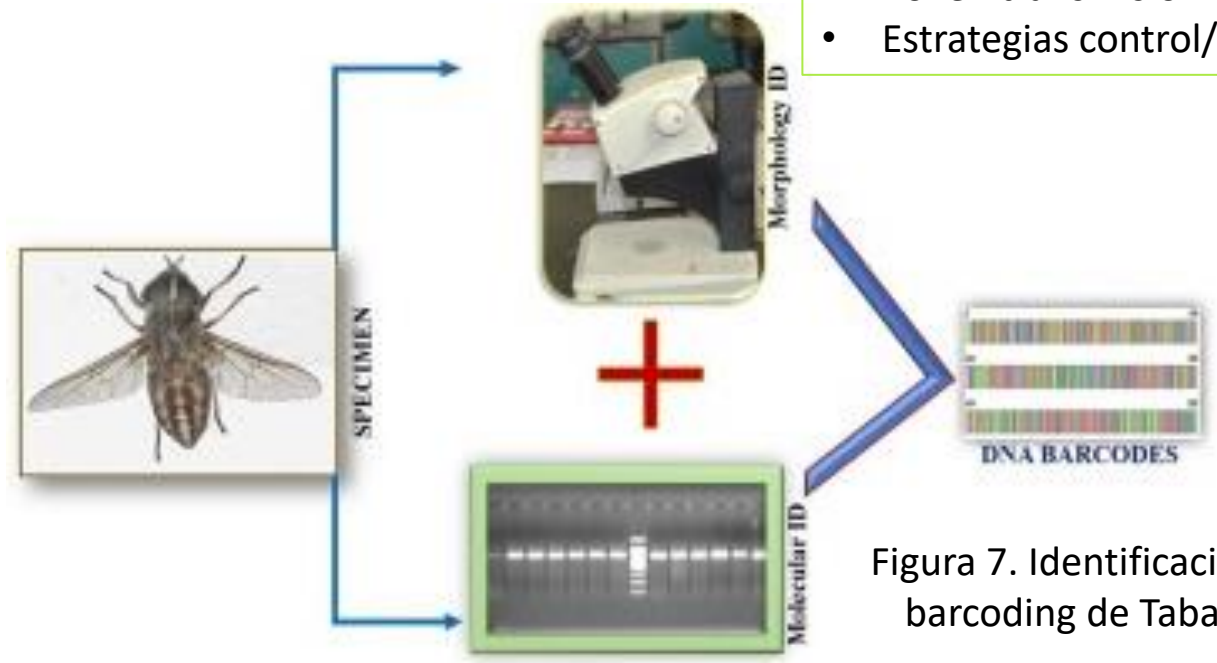


Figura 7. Identificación mediante ADN barcoding de Tabanidae (Diptera)

Bases de datos y modelos de distribución para especies del género *Tabanus*

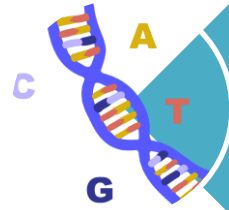
Objetivo General

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



Hipótesis

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



Determinar las condiciones óptimas para la extracción de ADN evaluando diferentes protocolos para insectos de la familia Tabanidae.



Establecer el protocolo de PCR Barcoding para insectos de la familia Tabanidae utilizando la región 28S.



Inferir la filogenia de la familia Tabanidae con las secuencias del gen 28S disponibles en bases de datos para contrastar con información de especies ya descritas.



Provincias:

Cotopaxi

Imbabura

Manabí

Napo

Orellana

Pastaza

Pichincha

Sto. Domingo de los Tsáchilas

Tungurahua

Tabla 1. Provincias incluidas en el muestreo

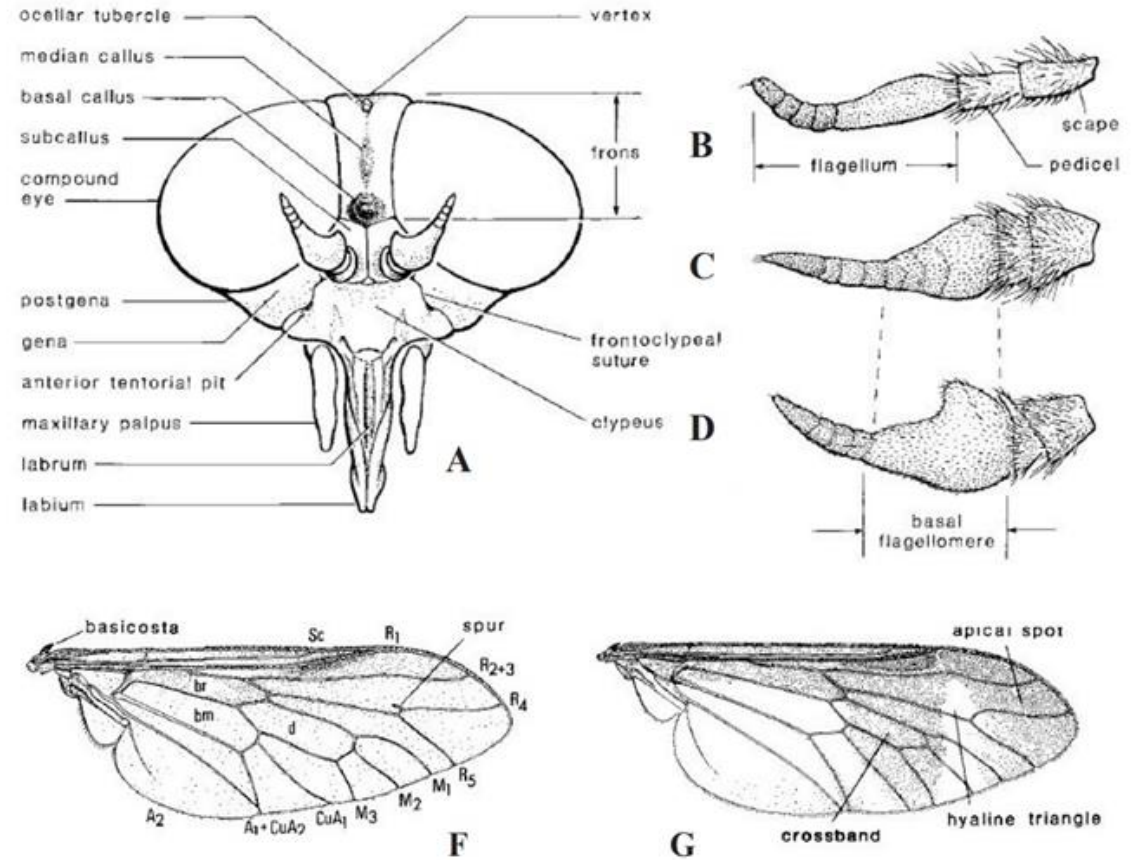


Figura 8. Características morfológicas de especies pertenecientes a la familia Tabanidae (A. cabeza, B–D. antena y F–G. venación del ala).

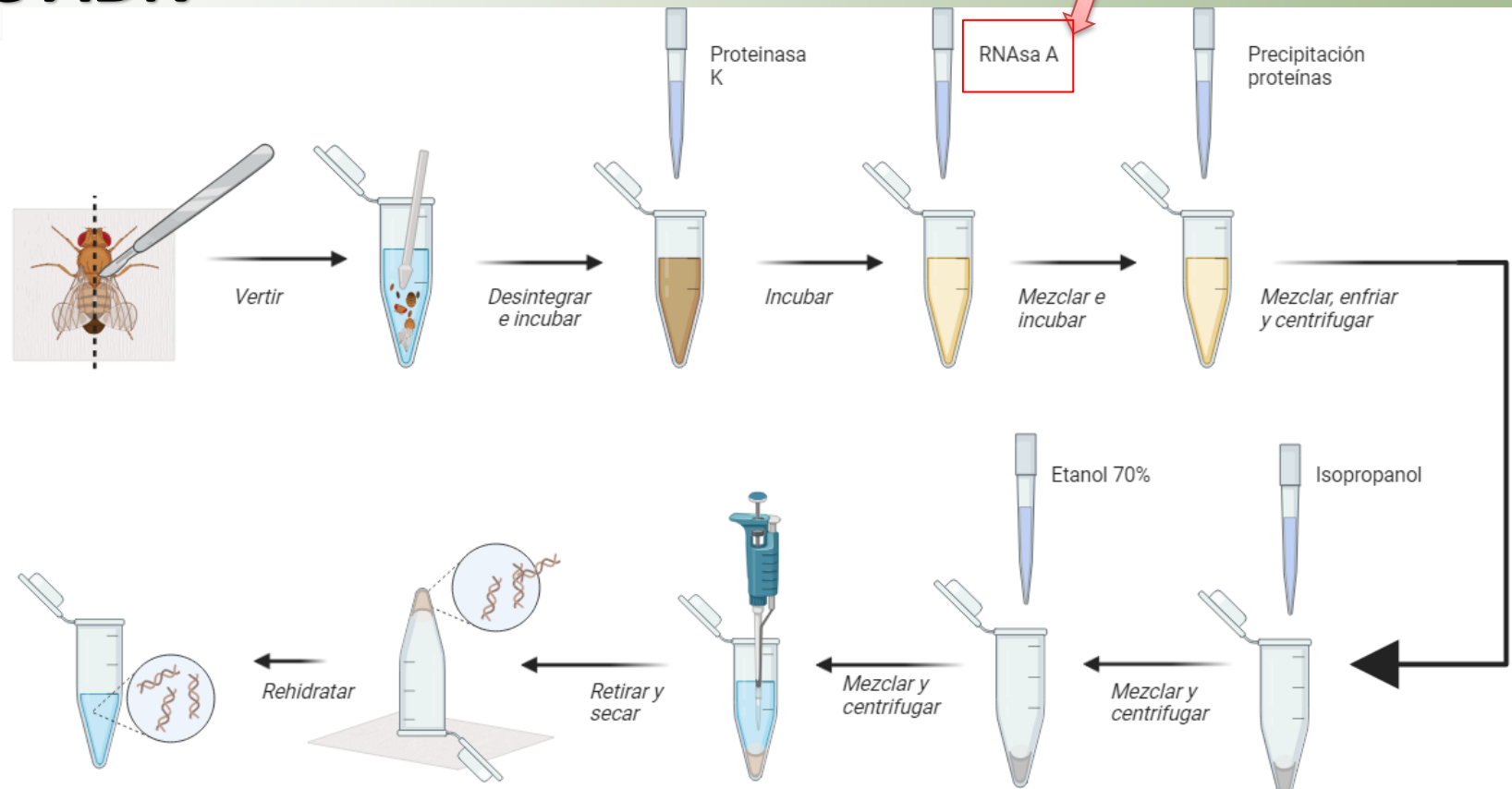


Figura 9. Protocolo de extracción de ADN utilizando kit.

Protocolo	Reactivos
Tejido animal (hígado y cerebro)	Solución de lisis de núcleos, proteinasa K 30mg/ml, RNAsa
Tejido animal (Cola de ratón)	Solución de EDTA 0.5 M, sol. de lisis de núcleos, proteinasa K 30mg/ml, RNAsa.

Tabla 2. Reactivos utilizados en cada protocolo

Primer	Secuencia 5' → 3'	Longitud (pb)
28K	GAA GAG CCG ACA TCG AAG	18
rc28F	GTG ATT TCT GCC CAG TGC TCT G	22

Tabla 3. Secuencias de primers utilizadas

Reactivo	Unidad	Protocolo (Lessard et al., 2013)
H2O	μL	
Buffer	X	5.00
28K	μM	0.50
rc28F	μM	0.50
MgSO4	mM	2.50
dNTP	mM	0,8
Taq	U/μL	1.50

Tabla 4. Mastermix establecido para la amplificación

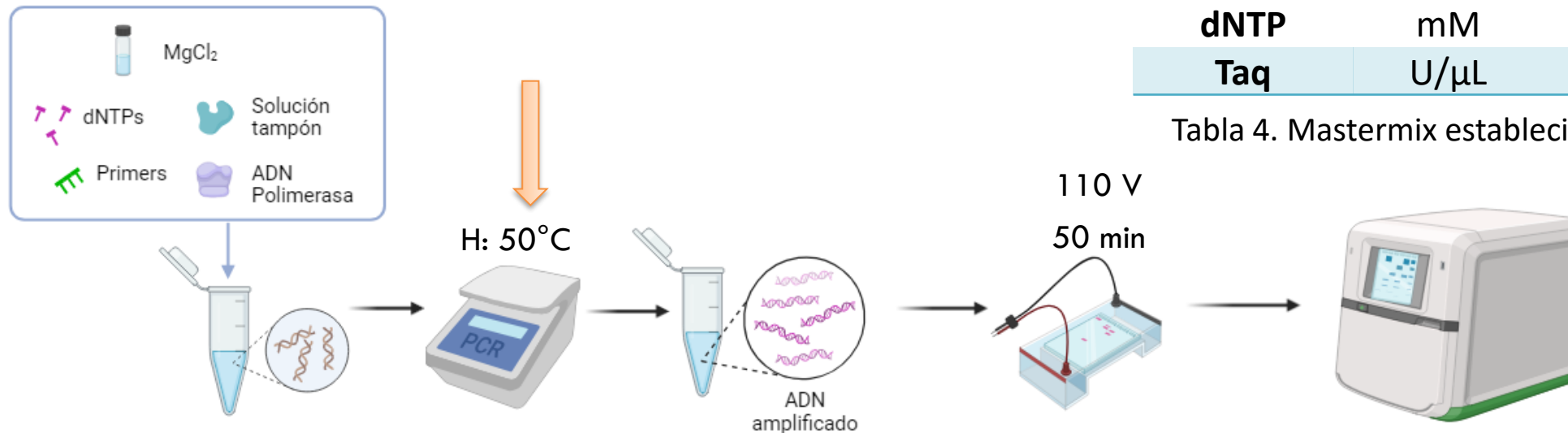
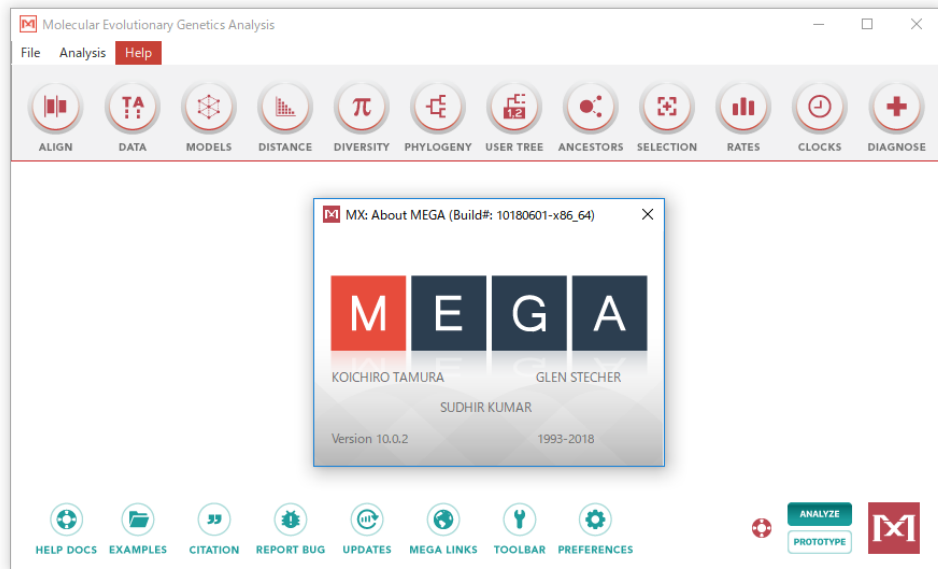


Figura 10. Protocolo para la amplificación del gen 28S en especímenes de la familia Tabanidae.

Gen 28S

30 secuencias



ANOVA

Comparar las medias de grupos para determinar si hay diferencias significativas entre ellos.

Tukey $\alpha=0.05$

Analizar las diferencias significativas entre las medias de los grupos analizados.

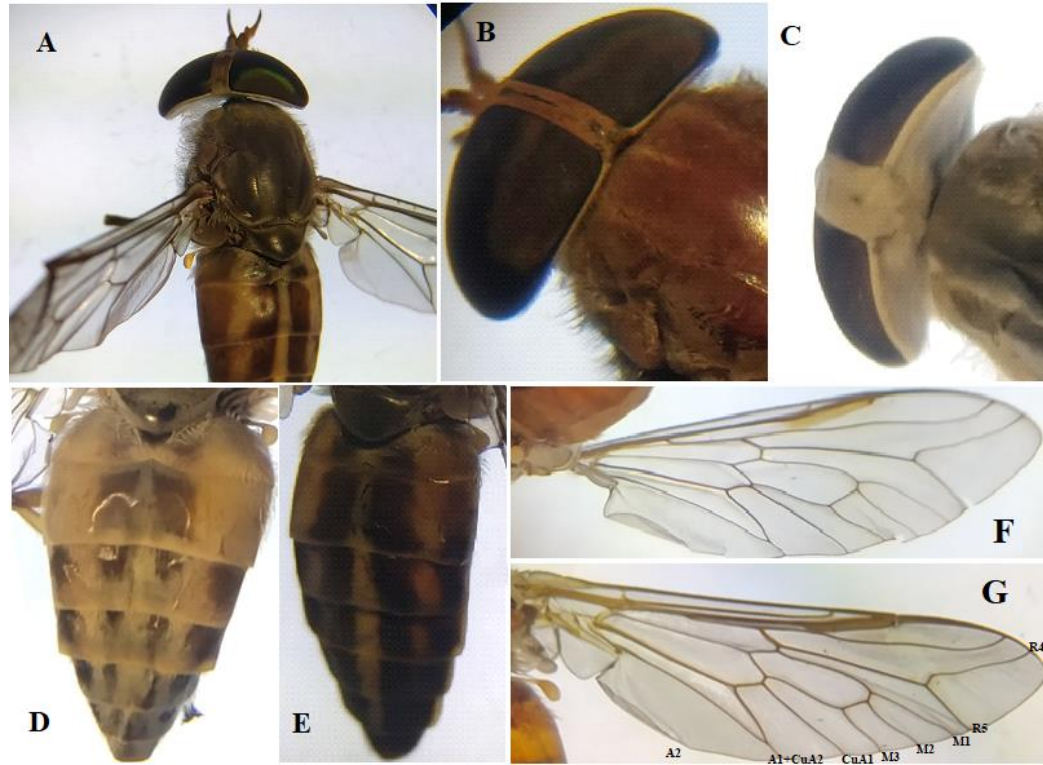


Figura 12. Imágenes de moscas Tabanidae identificadas: cuerpo completo vista superior (A), cabeza vista superior (B) e inferior (C), abdomen vista dorsal (D) y ventral (E), ala vista superior (F) y dividida por segmentos (G).



Figura 11. Muestras identificadas como especímenes de la familia Tabanidae de los cuáles se realizó la extracción de ADN junto al grupo excluyente (*Rhagionidae*).

Pureza A260/A230

1.8-2
< contaminantes orgánicos

Pureza A260/A280

1,8-2
< contaminación proteínas
> Contaminación química

Comparación de protocolos

Muestra	Protocolo	RNAasa	Tiempo	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN (ug/mL)
TA	Tejido animal	3uL	30min	1.22	0.48	46.22
TCR	Cola de ratón			2.54	2.08	1339

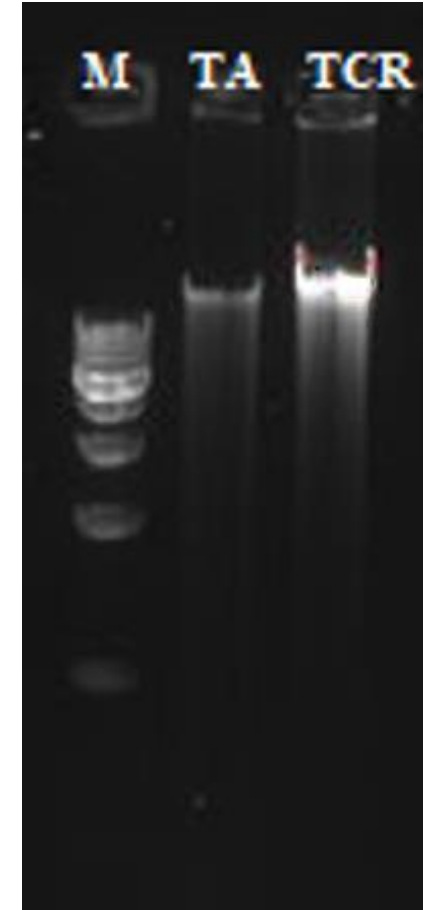
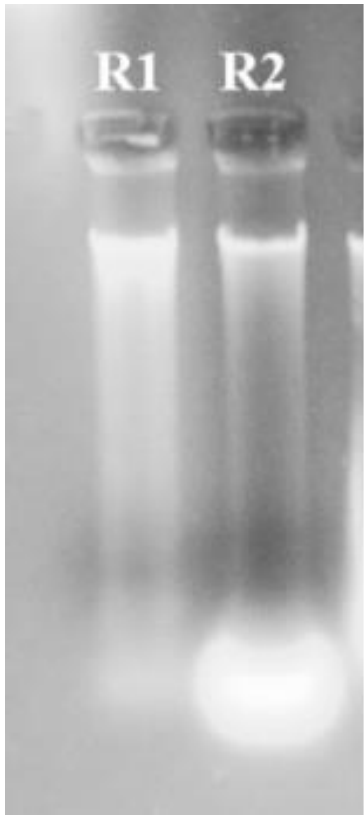


Figura 13. Visualización en gel de agarosa de los protocolos de extracción comparados.

Protocolo tejido cola de ratón



Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza	Pureza	ADN (ug/mL)
			A260/A230	A260/A280	
R1	-	-	2.58	2.01	1339
R2	-	-	0.98	1.95	151.1

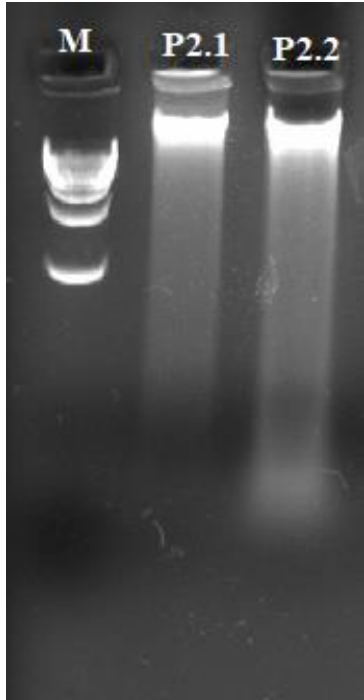
Evaluación de volúmenes de RNAsa y tiempos de incubación

Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza	Pureza	ADN (ug/mL)
			A260/A230	A260/A280	
P1.1	2 uL	3h	1.21	0.23	217.6
P1.2			1.83	1.02	941.2



Figura 14. Protocolo original para tejido de cola de ratón.

Figura 15. Primera prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón.



Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza	Pureza	ADN (ug/mL)
			A260/A230	A260/A280	
P2.1	4 uL	1h	1.31	0.26	58.06
P2.2			1.83	1.01	999.3

Eliminar el ARN disminuyendo la degradación del material genético

Muestra	RNAsa	Tiempo	Pureza	Pureza	ADN (ug/mL)
			A260/A230	A260/A280	
P3.1	4 uL	30min	0.89	0.13	127
P3.2			1.68	0.72	1010

Aumentar la concentración de ADN, disminuir la contaminación

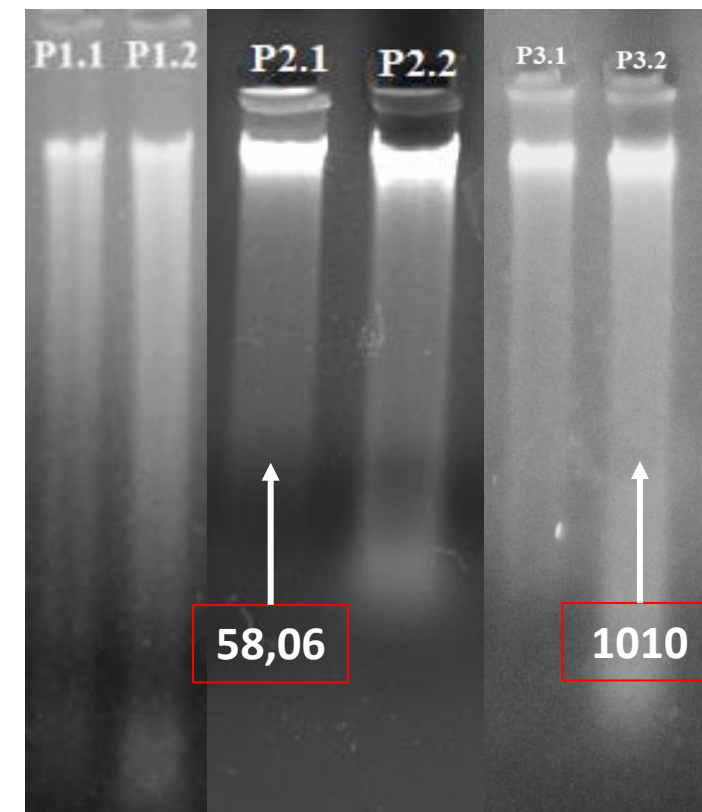


Figura 16. Tercera prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón.

Figura 15. Segunda prueba realizada en el protocolo para tejido de cola de ratón.

Muestra	RNAsa	Tiempo (min)	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN ug/mL
P1.1	2	180	1.21	0.23	217.6
P1.2	2	180	1.83	1.02	941.2
P2.1	4	60	1.31	0.26	58.06
P2.2	4	60	1.83	1.01	999.3
P3.1	4	30	0.89	0.13	127
P3.2	4	30	1.68	0.72	1010

F.V.	SC	gl	CM	p-valor
Modelo	1084766.08	3	361588.70	0.017
RNAsa	1265.67	1	1265.67	0.699
Tiempo	1585.63	1	1585.63	0.667
Repetición	1081914.78	1	1081914.78	0.0058
Error	12694.57	2	6347.29	
Total	1097460.66	5		



Muestra	Protocolo	RNAsa	Tiempo	Pureza	Pureza	ADN
				A260/A230	A260/A280	
TCR	Cola de ratón	3 uL	30min	1.40	0.75	167.6
TCR1			1h	1.78	0.46	70.1
TCR2		6 uL	30min	1.76	1.77	881.4
TCR3			1h	1.55	0.69	91.73
TA	Tejido animal	3 uL	30min	1.22	0.48	46.22
TA1			1h	1.53	0.76	73.57
TA2		6 uL	30min	1.35	0.74	225.7
TA3			1h	1.50	0.88	371.1

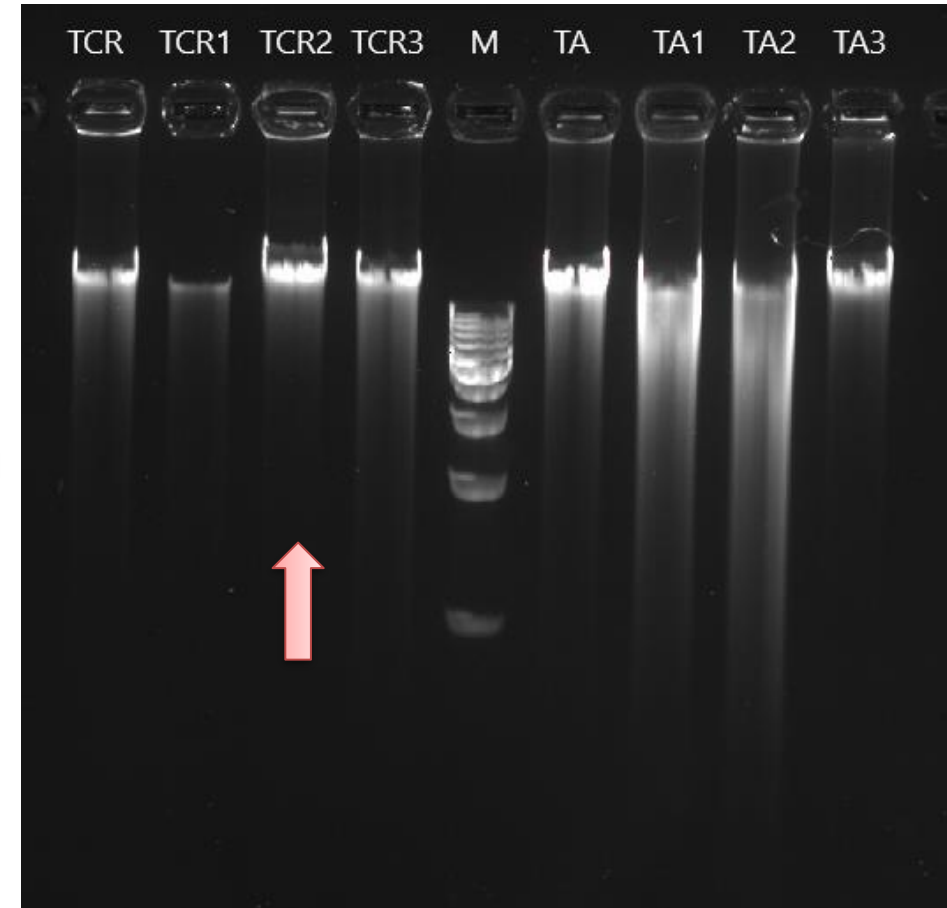
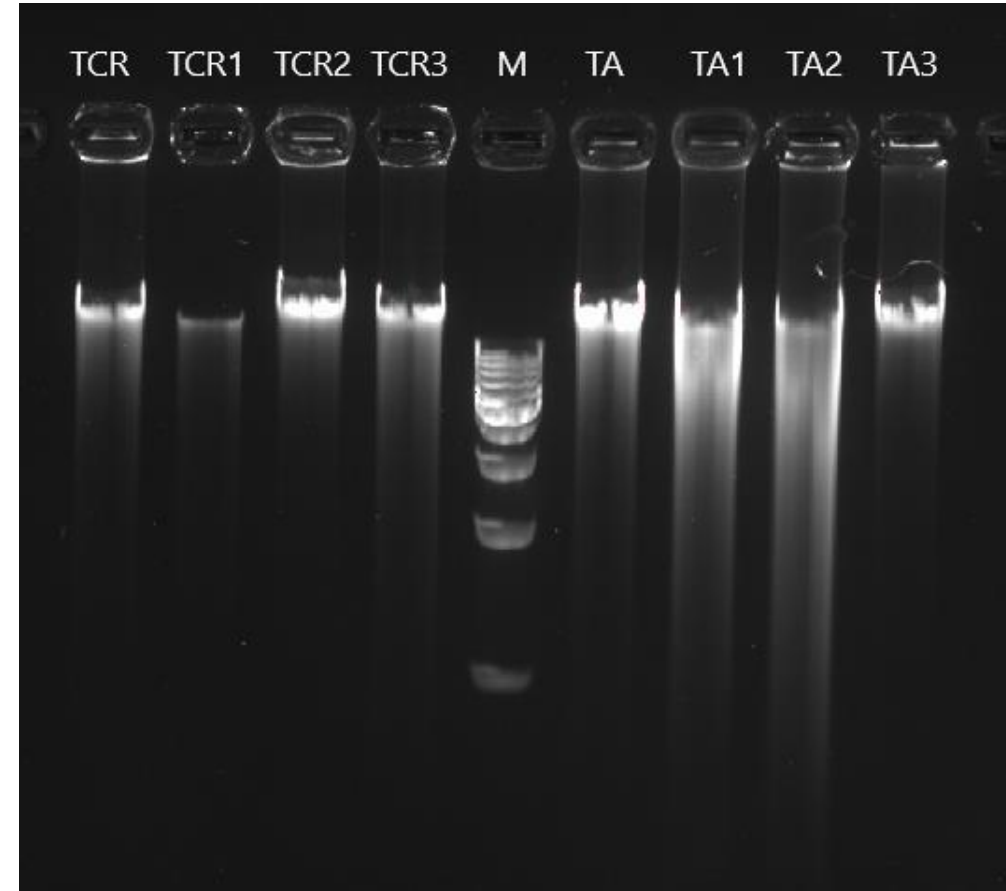


Figura 17. Variaciones en los dos protocolos de extracción comparados.

F.V.	SC	gl	CM	p-valor
Modelo	288752.56	3	96250.85	0.35
RNAsa	183751.34	1	183751.34	0.17
Tiempo	63799.49	1	63799.49	0.38
RNAsa*Tiempo	41201.72	1	41201.72	0.47
Error	261367.62	4	65341.9	
Total	550120.17	7		



RNAsa	Tiempo	Medias	
3uL	1h	71.84	A
3uL	30min	106.91	A
6uL	1h	231.42	A
6uL	30min	553.55	A



Muestra	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN ug/mL
Patas	1	1.36	16.94
	2	1.63	10.00
	3	1.75	28.27
	4	1.65	0.67

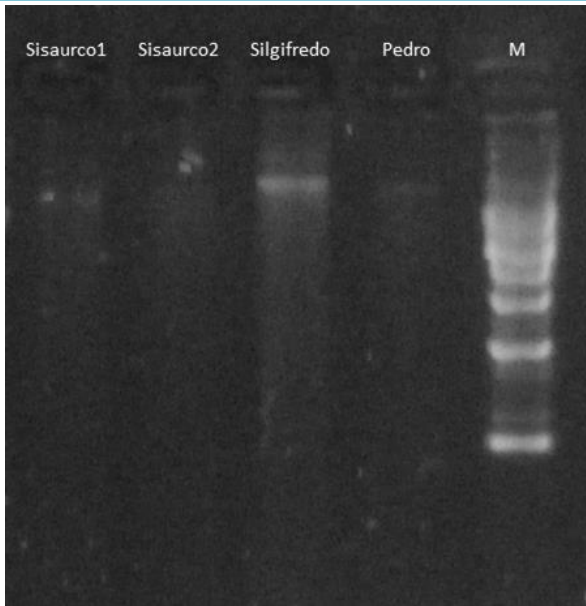


Figura 18. ADN extraído de patas

Muestra	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN ug/mL
Abdomen	1	1.82	467.80
	2	1.79	89.49
	3	1.81	203.80
Cabeza	1	1.61	18.06
	2	2.06	17.24
	3	1.96	22.24

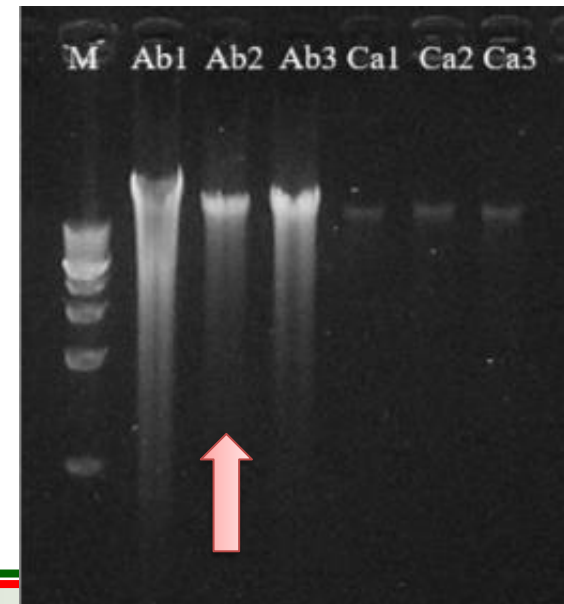


Figura 19. ADN extraído de abdomen y cabeza de insectos.

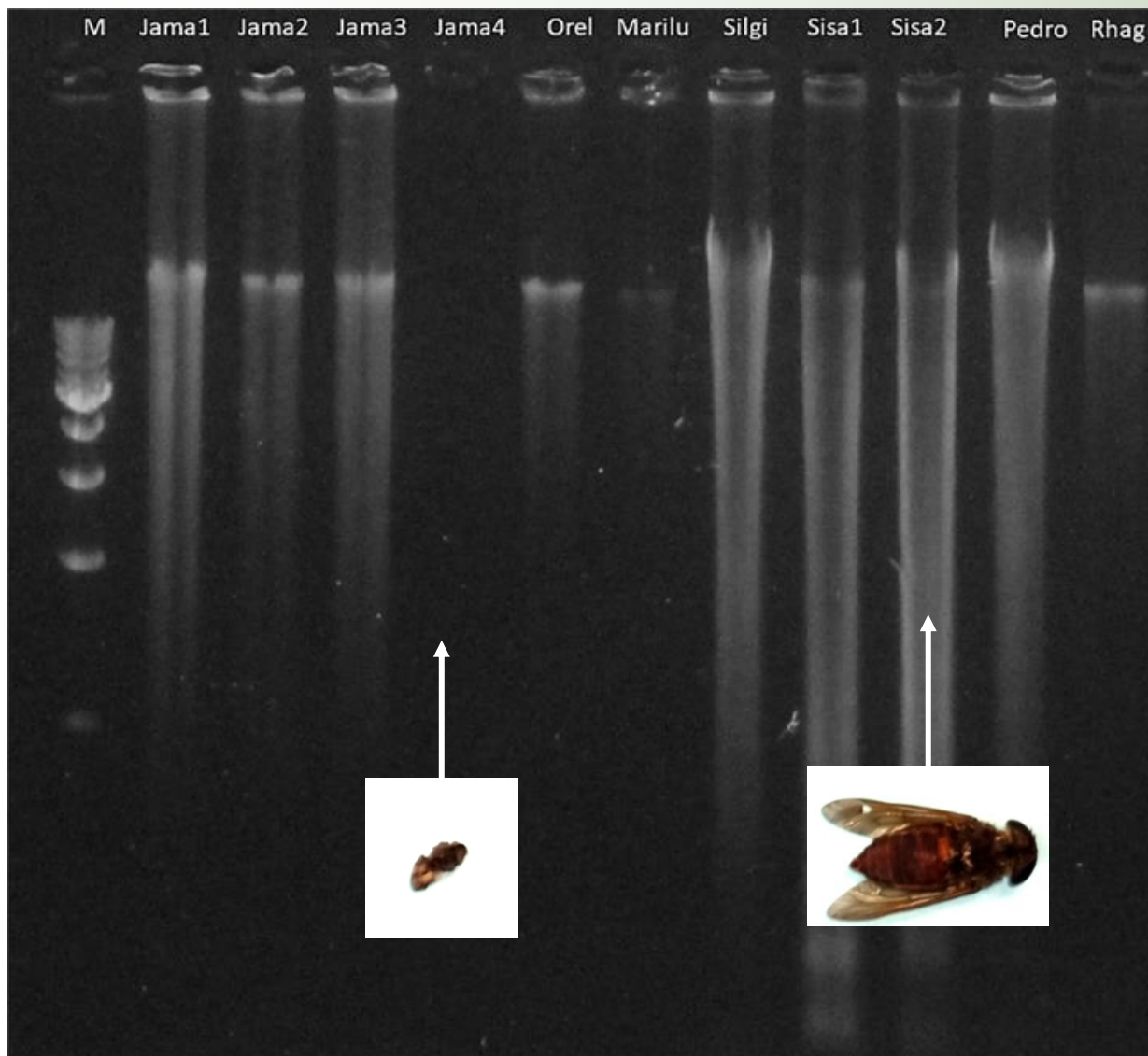


Figura 18. ADN extraído de especímenes de la familia Tabanidae junto al grupo excluyente.

Muestra	Pureza A260/A230	Pureza A260/A280	ADN ug/mL
Jama 1	1.78	1.08	315
Jama 2	1.90	1.44	278
Jama 3	1.85	1.51	426.40
Jama 4	1.51	0.15	7.86
Orellana	1.88	1.24	188.80
Mariluna	1.90	1.05	94.29
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
MEDIA	1.81	1.14	756.93

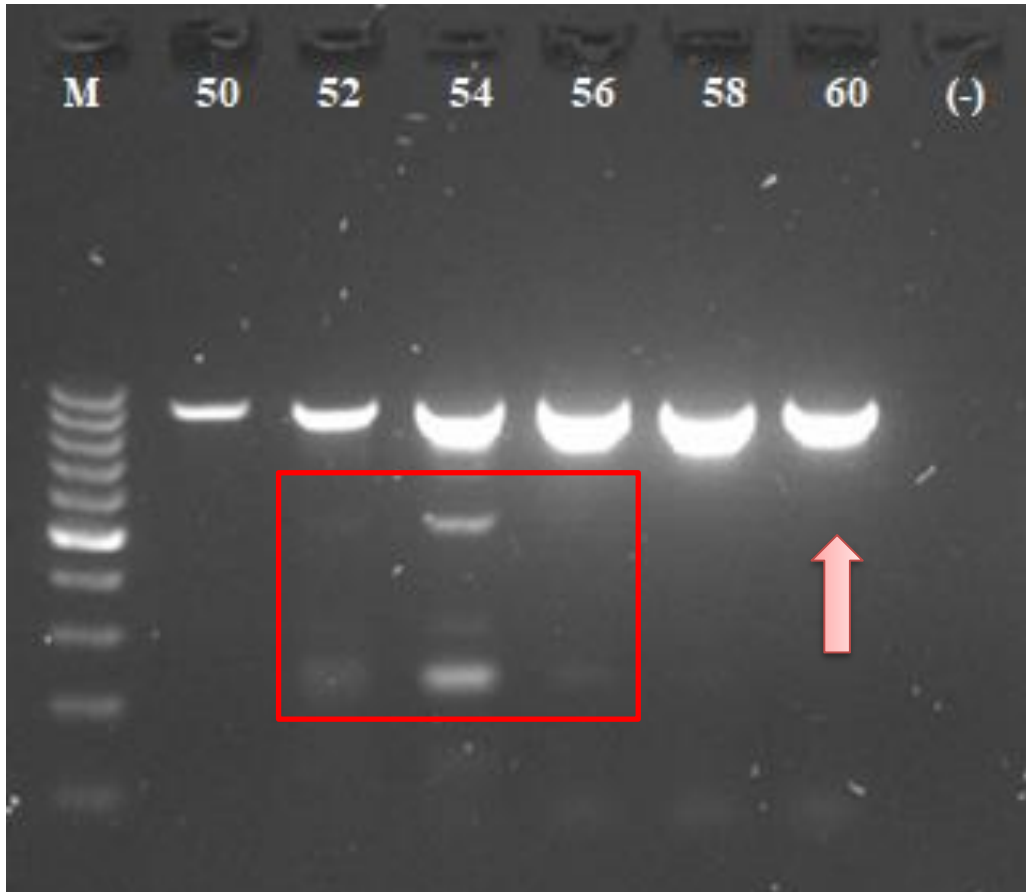


Figura 19. Gradiente de temperatura de hibridación (°C) evaluado

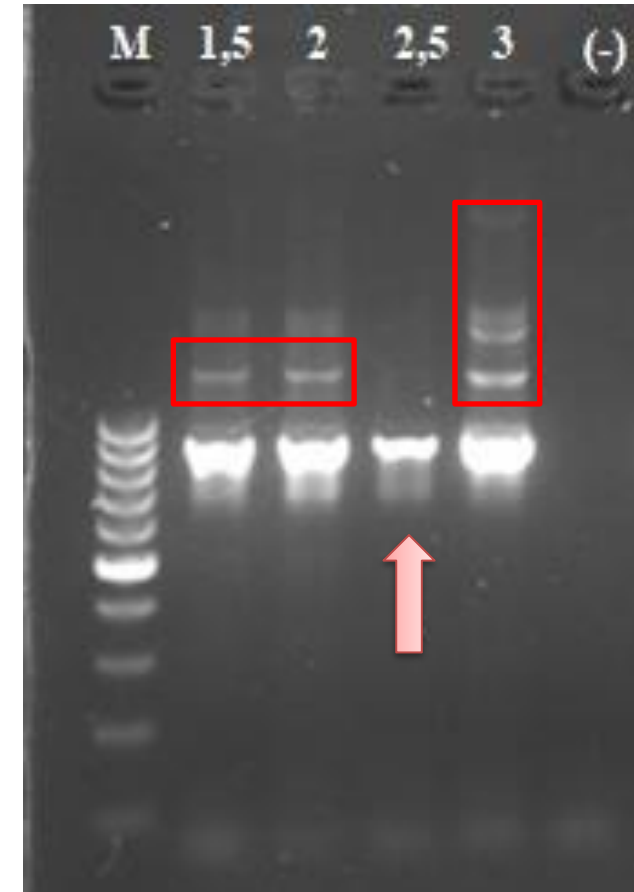


Figura 20. Gradiente de concentración de magnesio (mM) utilizado

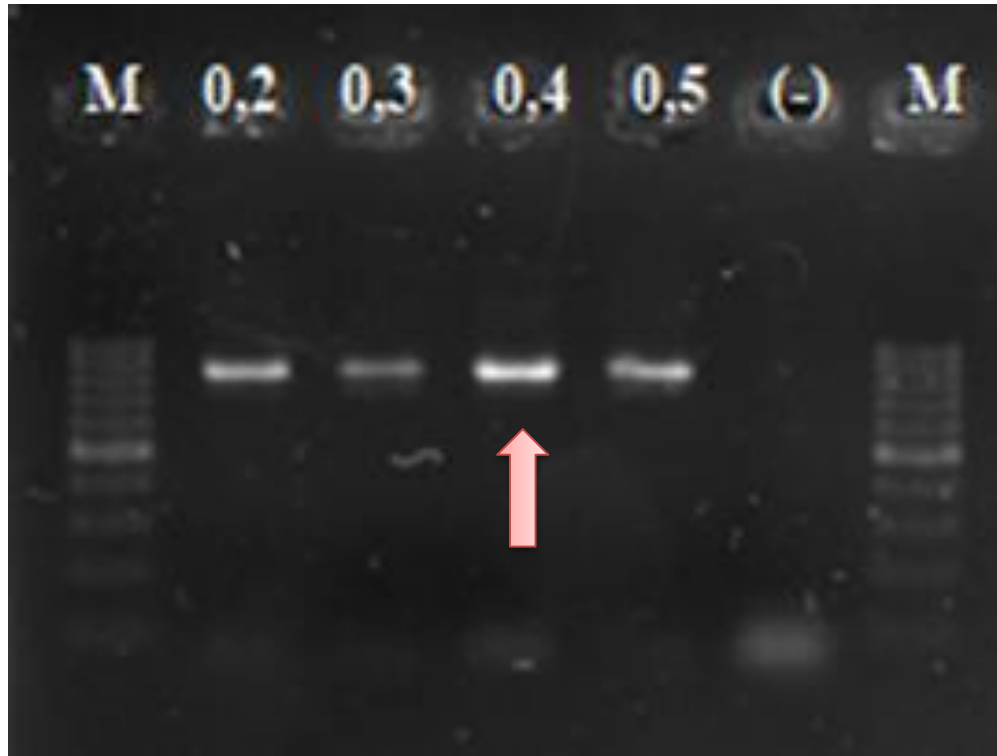


Figura 21. Gradiente de concentración de primer (μM) utilizado

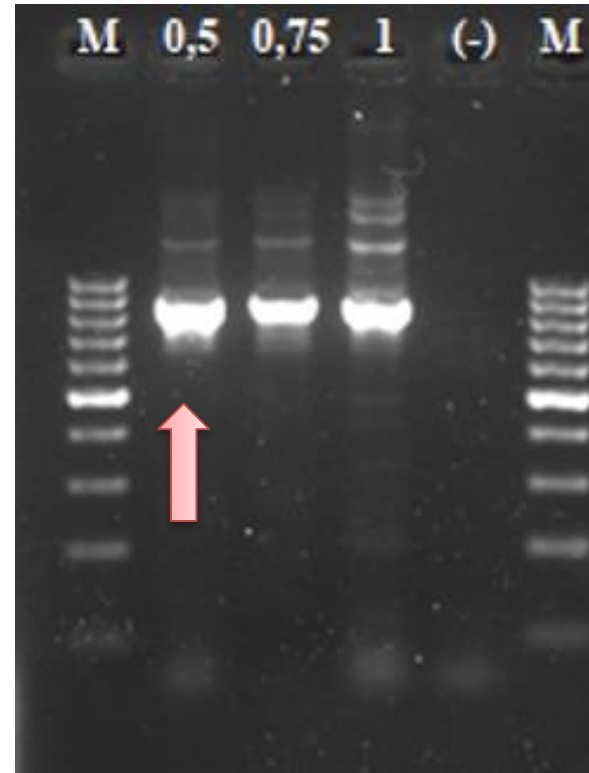


Figura 22. Gradiente de concentración de ADN Taq polimerasa ($\text{U}/\mu\text{L}$) utilizada

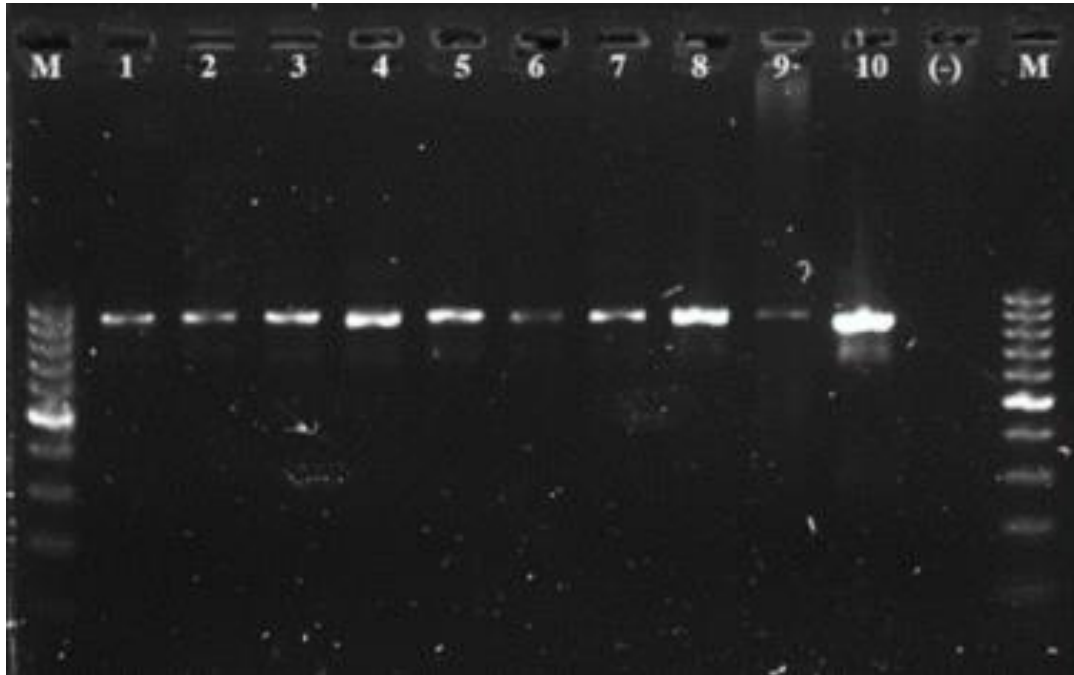
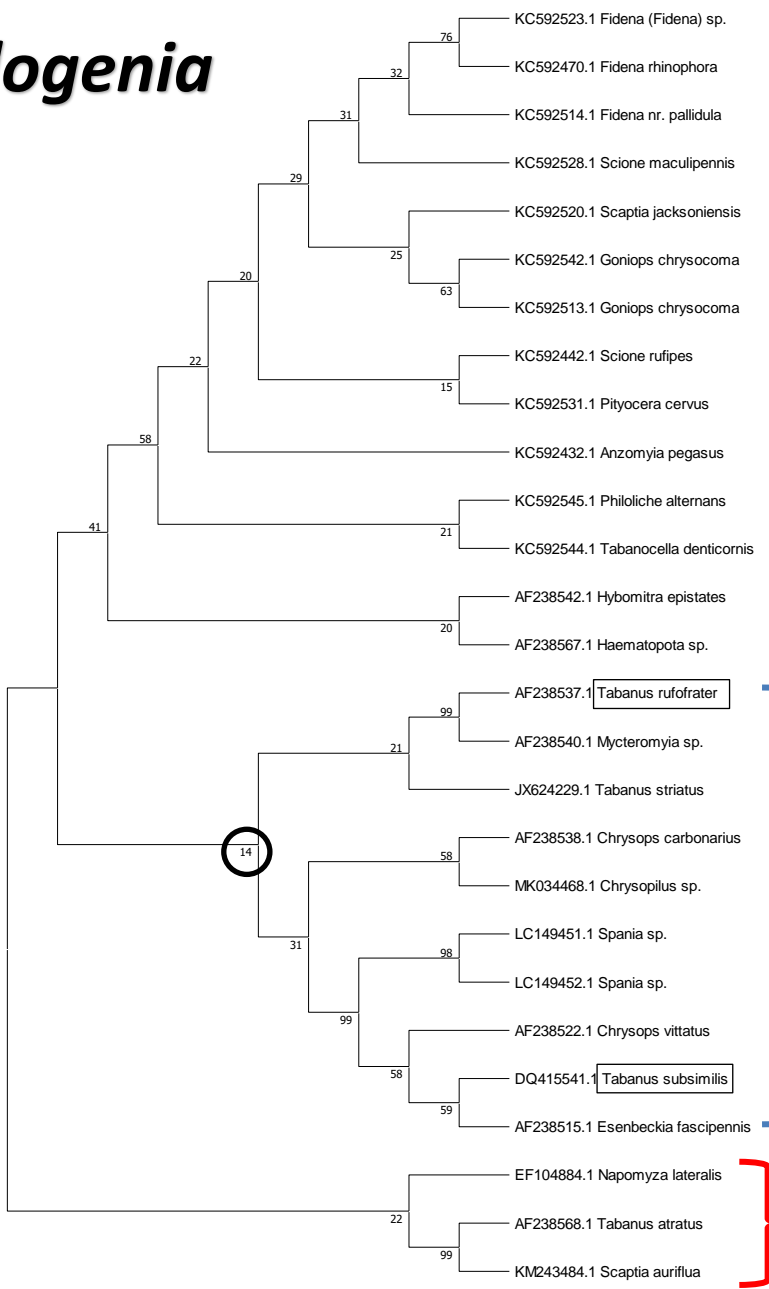


Figura 23. PCR optimizada para la amplificación del gen 28S en insectos de la familia Tabanidae

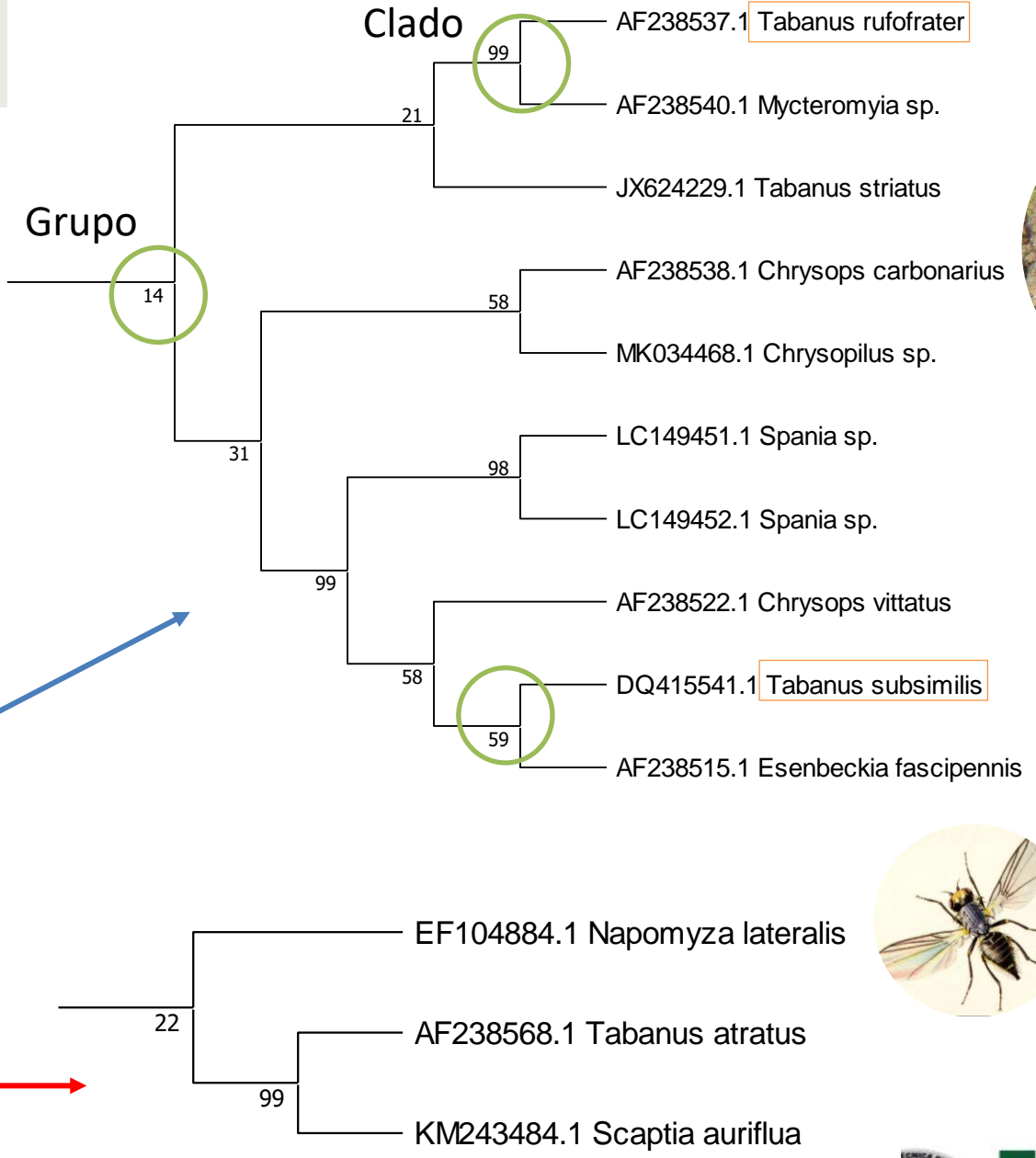
Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (μL)
H2O	μL	N/A		13,75
Buffer	X	5.00	1.00	5,00
28K	μM	10.00	0.40	1,25
rc28F	μM	10.00	0.40	1,25
MgSO4	mM	25.00	2.50	1,00
dNTP	mM	40.00	0.80	0,50
Taq	U/μL	5.00	0.5	0,25
ADN	ngr/ul	12.5	25.00	2,00
Total				25,00

Filogenia



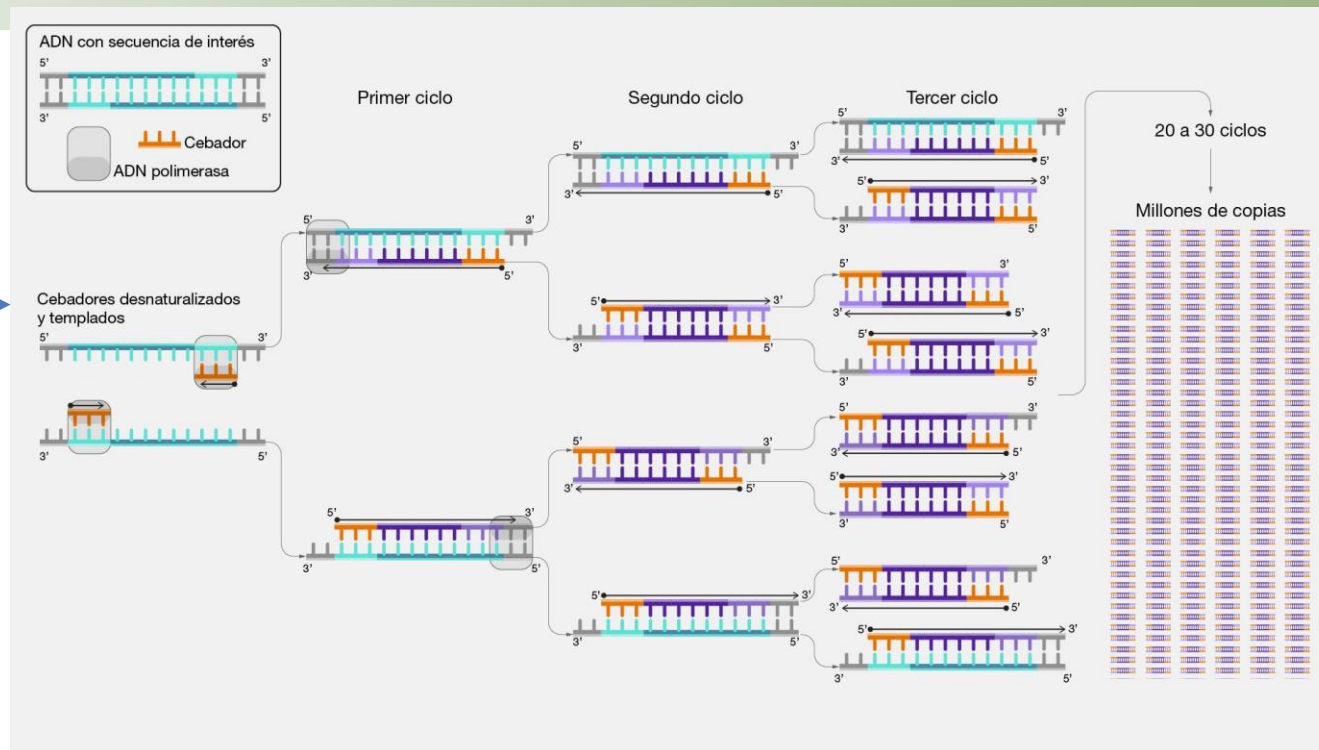
Clado

Grupo



E S P E
 ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
 CAMINO A LA EXCELENCIA

Resultados



Tabanus rufofrater



Tabanus subsimilis

- 1** collect sample and isolate DNA
- 2** amplify barcode DNA using PCR
- 3** confirm PCR with gel electrophoresis
- 4** sequence and compare to reference

Conclusiones

- Extraer ADN a partir de la sección del abdomen 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.
- Utilizar espacios de trabajo separados para minimizar la contaminación por ADN extraño.



ACADÉMIE
DE RECHERCHE ET
D'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR



Grupo de Investigación en
Sanidad Animal y Humana

Proyecto BruTryp



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Sarah Martin Solano, Ph.D.
Ing. Cristina Cholota, Mg. (cand.).
Ing. Michelle Yugcha

Familia, Novio y Amigos

Agradecimientos



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA