

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Diversidad genética de *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae)
en cuatro provincias de la zona norte y centro del Ecuador**

Katherine Jennifer Salazar Alekseyeva

Sonia Zapata, Ph.D., Directora de tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, diciembre de 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Diversidad genética de *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae)
en cuatro provincias de la zona norte y centro del Ecuador**

Katherine Jennifer Salazar Alekseyeva

Sonia Zapata, Ph.D.
Directora de tesis y
Miembro del comité de tesis

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Miembro del comité de tesis

Gabriel Trueba, Ph.D.
Miembro del comité de tesis

Stella de la Torre, Ph.D.
Decana del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

Quito, diciembre de 2014

© Derechos de autor

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la Universidad San Francisco de Quito para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Katherine Jennifer Salazar Alekseyeva

C.I.: 171548314-3

Fecha: Quito, diciembre de 2014

Dedicatoria

A mis padres, José y Svetlana, por permitirme llegar hasta aquí.

A mis hermanas, Irina y Natalia, por ser mis ejemplos a seguir.

A mis perros, por ser mi felicidad.

Большое спасибо всем

Agradecimientos

Al Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito y Departamento de Parasitología de la Universidad de Reims por el financiamiento de esta tesis.

A Moisés Gualapuro por la invaluable colección entomológica; a Andrea Torres por el material genético proporcionado de especies del subgénero *Hoffmania*; a Denis Augot por las secuencias proporcionadas de especímenes de *C. insignis* de la Isla de Guadalupe.

A Lorena Mejía, Gabriela Vasco, Jaime Chaves, Milton Gordillo y Dámaris Intriago por la ayuda proporcionada en el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del comité de tesis, María de Lourdes Torres y Gabriel Trueba, por la ayuda proporcionada en la revisión esta tesis.

Finalmente, agradecimiento infinito a mi directora de tesis, Sonia Zapata, por la confianza depositada en mí, además de toda la ayuda y conocimientos proporcionados en esta tesis.

Resumen

La fiebre catarral ovina (FCO) es una enfermedad causada por el virus de la lengua azul (VLA). *Culicoides insignis* es vector comprobado de VLA en Florida, América Central y el Caribe, y posible vector en América del Sur. Entre los años 2011 y 2013, se capturó un total de 3310 especímenes del género *Culicoides* en siete localidades de cuatro provincias del Ecuador (Bolívar, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha); de los cuales, 41 especímenes se identificaron como *C. insignis*. Se utilizó dos marcadores moleculares, uno mitocondrial para analizar la variabilidad intraespecífica de *C. insignis* y otro ribosomal para analizar la relación filogenética de *C. insignis* con otras especies del subgénero *Hoffmania*. Los resultados de este estudio mostraron que no existe poblaciones definidas de *C. insignis* en el Ecuador, así como tampoco patrón geográfico. En el país no se ha reportado la enfermedad, aunque previos estudios confirmaron la presencia de anticuerpos de VLA en ganado ovino, bovino y caprino tanto en la Región Costa como Sierra. Finalmente, *C. insignis* y *C. fernandoi* son especies con patrones de alas casi idénticos, por lo que el uso de marcadores moleculares resultó de gran utilidad en la identificación de estas especies.

Abstract

Ovine catarrhal fever (OCF) is a disease caused by bluetongue virus (BTV). *Culicoides insignis* is vector of BTV in Florida, Central America and the Caribbean, and possible vector in South America. Between 2011 and 2013, a total of 3310 specimens of the genus *Culicoides* were collected in seven different locations of four provinces from Ecuador (Bolívar, Esmeraldas, Imbabura and Pichincha); among which 41 specimens were identified as *C. insignis*. Two molecular markers were used, a mitochondrial marker to analyze intra-specific variability of *C. insignis* and a ribosomal marker to analyze the phylogenetic relationship between *C. insignis* and other species of the subgenus *Hoffmania*. The results of this study showed that there are no defined populations of *C. insignis* in Ecuador, neither a geographic pattern. In the country, the disease has not been reported, but previous studies confirmed the presence of BTV antibodies in sheep, cattle and goats in the coast and highland region. Finally, *C. insignis* and *C. fernandoi* are species with barely distinguishable wings patterns, so the use of molecular markers was very useful in the final identification of these species.

Tabla de contenidos

1.	Introducción.....	14
1.1.	Características del género <i>Culicoides</i>	14
1.2.	Morfología	14
1.3.	Clasificación	16
1.4.	Importancia como vectores	17
1.5.	Peste equina africana (PEA)	18
1.6.	Fiebre catarral ovina (FCO).....	18
1.7.	Culicoides como vectores de VLA	19
1.8.	<i>Culicoides insignis</i> como parte del subgénero <i>Hoffmania</i>	21
1.9.	Análisis molecular y alométrico	21
2.	Justificación.....	23
3.	Área de estudio	24
4.	Objetivos.....	24
4.1.	Objetivo general.....	24
4.2.	Objetivos específicos	24
5.	Materiales	25
5.1.	Identificación morfológica de especímenes.....	25
5.2.	Montaje de especímenes	25
5.3.	Extracción de ADN.....	25
5.4.	Amplificación de ADN	25
5.5.	Electroforesis	26
5.6.	Secuenciamiento	26
5.7.	Análisis molecular	26
5.8.	Análisis alométrico	26
6.	Métodos	27
6.1.	Colección de especímenes	27

6.2.	Identificación morfológica de especímenes.....	27
6.3.	Montaje de especímenes	27
6.4.	Extracción de ADN.....	27
6.5.	Amplificación de ADN.....	29
6.6.	Electroforesis	29
6.7.	Secuenciamiento	30
6.8.	Análisis molecular	30
6.9.	Análisis alométrico	30
7.	Resultados.....	30
7.1.	Colecciones de especímenes analizadas	30
7.2.	Identificación morfológica de especímenes.....	30
7.3.	Amplificación de ADN.....	30
7.4.	Análisis molecular del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI).....	31
7.5.	Análisis molecular del dominio D1-D2 del gen ribosomal 28S	31
7.8.	Análisis alométrico	32
8.	Discusión	32
8.1.	Identificación morfológica de especímenes de <i>C. insignis</i>	32
8.2.	Ausencia de <i>C. insignis</i> en Tiputini	33
8.3.	Análisis de la variabilidad genética de <i>C. insignis</i> mediante COI.....	33
8.3.1.	Poblaciones definidas de <i>C. insignis</i> del Ecuador e Isla de Guadalupe	33
8.3.2.	Baja variabilidad intraespecífica de <i>C. insignis</i> del Ecuador	34
8.3.3.	Implicaciones como posible vector de VLA en el Ecuador	36
8.4.	Análisis alométrico	38
8.5.	Relaciones filogenéticas de <i>C. insignis</i> con especies del subgénero <i>Hoffmania</i> ..	38
9.	Conclusiones.....	39
10.	Recomendaciones	39
11.	Bibliografía.....	40

12. Figuras	50
13. Tablas	59
14. Anexos	65

Lista de Figuras

Figura 1. Morfología del cuerpo de una hembra del género <i>Culicoides</i> , tomado de Wirth & Blanton, 1959.	50
Figura 2. Morfología del ala de una hembra del género <i>Culicoides</i> , adaptado de Rawlings, 1996.	50
Figura 3. Distribución mundial de VLA, adaptado de Ninio, 2011.	51
Figura 4. Distribución mundial de <i>C. insignis</i> , adaptado de Dices, 2014.	51
Figura 5. Brotes de FCO reportados en los años 2009-2014, tomado de OIE, 2014.	51
Figura 6. Mapa del Ecuador con las seis provincias donde se ha reportado la presencia de anticuerpos para VLA en ganado ovino, bovino y caprino, fuente López, et al., 1985, Mantilla, 1998; y Merino, 2011, adaptado de Dices, 2014.	52
Figura 7. Mapa del Ecuador con las siete localidades donde se capturó <i>C. insignis</i> , adaptado de Dices, 2014.	52
Figura 8. ADN mitocondrial (ADNmt) con el gen citocromo oxidasa I (COI), adaptado de Zapata, 2014.	53
Figura 9. ADN ribosomal (ADNr) con el dominio D1-D2 de la subunidad 28S, adaptado de Zapata, 2014.	53
Figura 10. Ala de una hembra de <i>C. insignis</i> con la localización anatómica de los 10 landmarks utilizados en el análisis alométrico.	53
Figura 11. Total de especímenes de <i>C. insignis</i> capturados por provincia.	54
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y bromuro de etidio al 0,15% de la amplificación de COI de especímenes de <i>C. insignis</i> del Ecuador.	54
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y bromuro de etidio al 0,15% de la amplificación de D1-D2 de especímenes de <i>C. insignis</i> del Ecuador.	54
Figura 14. Árbol filogenético de COI obtenido por el método de Maximum-Likelihood (ML) de especímenes de <i>C. insignis</i> de Ecuador (ECUA) e Isla de Guadalupe (GUAD); y <i>C. fernandoi</i> de Ecuador (ECUA). Especímenes de Bolívar (B) Caluma (CA) y Echeandía (EC); de Esmeraldas (E) Sto. Domingo de Onzole (SD); de Imbabura (i) Cachaco (CH); y de Pichincha (P) Pacto (PA), Paraíso Escondido (PE) y Puerto Quito (PQ).	55
Figura 15. Árbol filogenético de D1-D2 obtenido por el método de Maximum-Likelihood (ML) de especímenes de <i>C. insignis</i> y otras especies del subgénero <i>Hoffmania</i> de Ecuador (ECUA) y <i>C. insignis</i> de la Isla de Guadalupe (GUAD). Especímenes de Bolívar (B) Caluma (CA) y Echeandía (EC); de Esmeraldas (E) Sto. Domingo de Onzole (SD); de	

Imbabura (i) Cachaco (CH); y de Pichincha (P) Pacto (PA), Paraíso Escondido (PE) y Puerto Quito (PQ).....	56
Figura 16. Análisis discriminativo (DA) de alas de 36 hembras de <i>C. insignis</i> . 1. Caluma (Bolívar); 2. Echeandía (Bolívar); 3. Sto. Domingo de Onzole (Esmeraldas); 4. Cachaco (Imbabura); 5. Pacto (Pichincha); 6. Paraíso Escondido (Pichincha) 7. Puerto Quito- (Pichincha).....	57
Figura 17. Comparación del patrón de alas de <i>C. fernandoi</i> (i2.CH) y <i>C. insignis</i> (E8.SD). Los círculos indican las diferencias morfológicas entre estas dos especies, dos áreas blancas en <i>C. fernandoi</i> y un área blanca en <i>C. insignis</i> tanto en la celda r5 como m1.....	57
Figura 18. Distribución del ganado bovino y ovino en las tres regiones del Ecuador, fuente INEC, 2013.....	58
Figura 19. Número de cabezas de ganado bovino y ovino en cuatro provincias del Ecuador en el año 2013, fuente INEC, 2013.	58

Lista de Tablas

Tabla 1. Casos reportados de FCO en los países de América del Sur en los años 2010-2014, fuente OIE, 2014.	59
Tabla 2. Descripción de los sitios de colección de especímenes de <i>C. insignis</i>	60
Tabla 3. Lista de especímenes de <i>C. insignis</i> de acuerdo al sitio de colección y sexo.....	61
Tabla 4. Variabilidad nucleotídica de las secuencias alineadas de COI (433pb) de especímenes de <i>C. insignis</i> de Ecuador (ECUA) e Isla de Guadalupe (GUAD); y <i>C. fernandoi</i> de Ecuador (ECUA). Se presenta 20 sitios informativos. Los números en la parte superior, leyéndose de forma vertical, representan la posición del nucleótido en la secuencia. Los puntos (.) representan igualdad en la base nitrogenada, mientras que los guiones (-) representan deleciones o inserciones. Además se presentan 7 haplotipos en los especímenes <i>C. insignis</i> del Ecuador.....	62
Tabla 5. Variabilidad nucleotídica de las secuencias alineadas de D1-D2 (683 pb) de especímenes de <i>C. insignis</i> de Ecuador (ECUA) e Isla de Guadalupe (GUAD); y especies del subgénero <i>Hoffmania</i> de Ecuador. Se presenta 16 sitios informativos. Los números en la parte superior, leyéndose de forma vertical, representan la posición del nucleótido en la secuencia. Los puntos (.) representan igualdad en la base nitrogenada, mientras que los guiones (-) representan deleciones o inserciones. Además se presenta 7 haplotipos en los especímenes <i>C. insignis</i> de Ecuador e Isla de Guadalupe.	64

1. Introducción

1.1. Características del género *Culicoides*

Ceratopogonidae es una familia perteneciente al reino Animalia, filo Arthropoda, clase Insecta y orden Diptera (Borkent, 2012b). Esta familia está formada por más de 4000 especies y 109 géneros, de los cuales, solo cuatro se alimentan de sangre, *Austroconops*, *Forcipomyia* subgénero *Lasiohelea*, *Leptoconops*, y *Culicoides* (Beckenbach & Borkent, 2003; Goffredo & Meiswinkel, 2004).

El género *Culicoides* fue descrito por Pierre André Latreille en 1809. Este género es el más grande de la familia Ceratopogonidae y está formado por un total de 1290 especies, de las cuales 1260 están vivas y 30 extintas (Gomulski, et al., 2006). Los culicoides, también conocidos como jejenes, son dípteros de 1,5-3 mm de longitud en fase adulta con la probóscide más larga que la cabeza (McAlpine, et al., 1981; Florêncio, et al., 2010; Augot, et al., 2013).

La distribución del género es mundial, desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm, a excepción de Nueva Zelanda, Antártica y Antártida (Mellor, et al., 2000). La presencia de este género se ve determinada principalmente por factores climáticos como temperatura, humedad y precipitación, además del tipo hábitat y presencia de materia orgánica (González, et al., 2013).

1.2. Morfología

La morfología del cuerpo del género *Culicoides* es peculiar, pero similar a la de otros géneros de la familia Ceratopogonidae (Goffredo & Meiswinkel, 2004). El cuerpo de éstos se divide en tres segmentos principales, cabeza, tórax y abdomen (Figura 1) (McAlpine, et al., 1981).

Cabeza: La cabeza es globular con la región anteroposterior aplanada (Delécolle, 1985). Los ojos son grandes y reniformes, formados por omatidios, es decir, conjunto de elementos hexagonales (Forattini, 1957). El grado de separación o unión entre éstos es útil en la diferenciación de especies del género *Culicoides* (Wirth & Blanton, 1974; Swanson, 2012).

En la región anterosuperior se encuentran las antenas. En literatura antigua, éstas estaban constituidas por quince segmentos sin distinción, pero actualmente están constituidas por tres segmentos, base, pedicelo y flagelo. La base es un anillo que se une directamente a la cabeza; pedicelo es un glóbulo que se une al flagelo; y el flagelo son trece flagelómeros finales (Forattini, 1957; Swanson, 2012).

Las antenas son sexualmente dimórficas. En hembras, los flagelómeros del I al VIII son cortos y con verticilos largos, y los flagelómeros del IX al XIII son más largos y sin verticilos; mientras que en machos, los flagelómeros del I al X son cortos y con verticilos extremadamente largos que forman estructuras como plumas, y los flagelómeros del XI al XIII son más largos y sin verticilos (Wirth & Blanton, 1974). No obstante, en algunas especies como *C. leechi* y *C. utahensis*, las antenas con estructura plumosa están ausentes, por lo que se asemejan a las de hembras (Swanson, 2012).

La boca está constituida por cinco segmentos, labro, mandíbulas, maxilas, labio e hipofaringe (Delécolle, 1985). En la región anterosuperior se encuentra el labio, mientras que en la región anteroposterior se encuentra el labro, mandíbulas, maxilas e hipofaringe (Forattini, 1957). A excepción de las maxilas, el labro, mandíbulas e hipofaringe poseen dientes distales esclerotizados como cuchillos (Wirth & Blanton, 1959).

Tórax: El tórax es ancho y convexo hacia la región anteroinferior (Wirth & Blanton, 1974). Este está constituido por tres segmentos, protórax, mesotórax y metatórax, que a su vez, cada uno está formado por otros tres segmentos, el protórax por pronoto, prosterno y propleuras; el mesotórax por mesonoto, mesoterno y mesopleuras; y el metatórax por metanoto, metaterno y metapleuras (Forattini, 1957; Delécolle, 1985).

En varias especies, el mesonoto posee un patrón distintivo que es más visible en especímenes frescos, pero también puede ser observado en especímenes montados (Wirth & Blanton, 1974). El patrón es un diseño simétrico con respecto a la línea media que puede ser claro u oscuro, de color café o negro, pero también puede ser café amarillento o naranja (Forattini, 1957).

Las extremidades son cortas y delgadas, seis en total, dos delanteras, dos intermedias y dos traseras (Forattini, 1957). Cada extremidad está constituida por cinco segmentos, coxa, trocánter, fémur, tibia y tarsos, que a su vez, cada uno está formado por basitarso, tarsos y pretarso o par de garras (Swanson, 2012). Las garras son pequeñas e iguales, en hembras simples, pero en machos divididos en los vértices (Wirth & Blanton, 1974).

Las alas también son sexualmente dimórficas. En hembras, estas son cortas y anchas, mientras que en machos son largas y estrechas (Wirth & Blanton, 1974). Generalmente, las alas poseen un patrón de pigmentación característico, es decir, una disposición de áreas claras y oscuras sobre un fondo claro u oscuro (Rawlings, 1996; Perruolo, 2009). Este es característico para cada especie, por lo que es útil en la identificación morfológica (Conne-

lly, 2005; Veggiani, et al., 2011). Las alas están formadas por venas, celdas y elementos anexos (Figura 2).

La vena radio-mediana (R-M) se bifurca en las venas R1, R2 y R3; las venas R4 y R5 se perdieron en el género *Culicoides*, pero pueden ser observadas en otros miembros de la familia Ceratopogonidae (Swanson, 2012). La vena mediana (M) se bifurca en las venas M1 y M2; la vena cubital (Cu) en Cu1 y Cu2; y la vena anal está poco desarrollada que no alcanza la costa (Perruolo, 2009).

Las celdas se nombran de acuerdo a las venas que bordean, es decir, celda r1, r2, r5, m, m1, m2, cu y anal (Perruolo, 2009; Bellis, 2014). Además, poseen elementos anexos que son las microtriquias y macrotriquias. Las microtriquias son pelos independientes cortos y las macrotriquias son pelos articulados largos que juntos proporcionan un patrón de alas característico (Wirth & Blanton, 1974).

Abdomen: El abdomen es generalmente de color oscuro y está constituido por diez segmentos (Forattini, 1957). A su vez, cada segmento está formado por tergitos, esternitos y pleuritos. En hembras, el abdomen es relativamente fuerte debido a que debe expandirse durante la alimentación con sangre y oogénesis, en cambio en machos es delgado con los genitales prominentes (Wirth & Blanton, 1974; Swanson, 2012).

En hembras, el órgano sexual primario es la espermateca. Esta es globular y esclerotizada, unida por conductos que convergen, por lo general para formar un anillo esclerotizado (Swanson, 2012). La espermateca puede ser una, dos o tres, pero la mayoría de especies poseen dos y una tercera rudimentaria o sin función (Forattini, 1957). Por otro lado, en machos, el órgano sexual secundario es el hipopigium. El número y forma de la espermateca, además de la forma del hipopigium, son útiles en la diferenciación de especies del género *Culicoides* (Wirth & Blanton, 1974).

1.3. Clasificación

La clasificación subgenérica del género *Culicoides* se basa en la fenética, es decir, en similitudes morfológicas u otras características observables, sin considerar la filogenética (Flores, 2007; Borkent, 2012a). En un inicio, esta clasificación se encontraba en un estado tan deplorable que simplemente se enlistaba las especies alfabéticamente. En la actualidad, el estado de la clasificación ha mejorado, pero aún es confusa.

En 1937, Root y Hoffman clasificaron al género *Culicoides* en dos grupos, “A” y “B”, donde cada uno comprendía diversos subgrupos separados por la presencia o ausencia de un área oscura en la celda r2 y otra área oscura o mancha postestigmatizada en el ex-

tremo de la costa o cerca de ésta en la celda r5. En 1954, Khalaf clasificó al género en 3 subgéneros, *Oeacta Poey*, *Selfia Khalaf* y *Monoculicoides Khalaf*, pero su trabajo fue exclusivamente fenético basado en la morfología de los genitales.

Actualmente, el patrón de alas es la característica más utilizada para clasificar al género *Culicoides* en subgéneros, pero también se utiliza algunas medidas morfométricas como la longitud del ala, proporción costa, tercer segmento de los palpos maxilares, entre otros (Wirth & Arnaud, 1969; Swanson, 2012). Además, detalles de los patrones del mesonoto; tamaño y forma de los segmentos de las antenas; distribución de pozos sensoriales en las antenas; posición relativa de los ojos; forma y número de espermateca en hembras y forma del hipopigium en machos, han sido necesarios para clasificar al género en subgéneros (Rawlings, 1996; Augot & Depaquit, 2010).

El número de subgéneros, grupos de especies y especies del género *Culicoides* dependerá del autor y región. En el Neotrópico, según Wirth, et al. (1988) existe 246 especies clasificadas en 13 subgéneros y 19 grupos de especies. En las Indias Occidentales, según Wirth & Blanton (1974) existe 24 especies clasificadas en 6 subgéneros. Finalmente, en el Neoártico, según Swanson (2012) existe 150 especies clasificadas en 13 subgéneros y 7 grupos de especies.

Como se puede observar, no existe un consenso en la clasificación subgenérica del género *Culicoides* lo que causa un caos taxonómico. Los principales problemas son que existe clasificaciones regionales y no mundiales, y trabajos antiguos que no incluyen nuevas especies (Garros, et al., 2009; Borkent, 2012b). Además, existe especies pobremente descritas e ilustradas (Huerta, 2007).

En 2012 Borkent clasificó a 1322 especies del género *Culicoides* en 31 subgéneros y 38 grupos de especies. Sin embargo, algunas especies todavía poseen una agrupación incierta por lo que se las agrupo en “miscellaneous unplaced species”. Consecuentemente, es necesario un estudio mundial más específico de las relaciones filogenéticas de las especies del género *Culicoides*.

1.4. Importancia como vectores

La importancia del género *Culicoides* radica en la hematofagia del 96% de sus especies, es decir, el hábito de las hembras de alimentarse de sangre para madurar los huevos (Wirth & Blanton, 1974). Consecuentemente son reservorios y vectores de varios nemátodos, protozoos y virus que afectan tanto al ser humano como a animales (Glick, 1990; Ayllón, et al., 2014).

Las especies del género *Culicoides* son vectores de arbovirus (Rawlings, 1996). Alrededor del mundo, más de 50 arbovirus han sido aislados de especies de este género, 20 de la familia Bunyaviridae; 19 de la Reoviridae y 11 de la Rhabdoviridae (Lopes & De Sousa, 2010). No obstante, existen pocas enfermedades virales de importancia humana y veterinaria transmitidas por este género.

La peste equina africana (PEA) y fiebre catarral ovina (FCO) son dos enfermedades de importancia veterinaria debido al impacto que causan en la economía y salud del animal (Ninio, 2011). Consecuentemente, están incluidas entre las 15 enfermedades de la “Lista A” de la Oficina Internacional de Epizootias, parte de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

1.5. Peste equina africana (PEA)

La peste equina africana (PEA) es una enfermedad viral que afecta a équidos (Swanson, 2012). Esta se transmite entre sus hospedadores por la picadura de algunas especies del género *Culicoides* (Linton, et al., 2002). Sin embargo, *C. imicola* es el único vector comprobado, pero se sospecha que *C. bolitinos* también puede ser otro vector (Mellor, et al., 2000).

Los signos clínicos de la enfermedad son disnea, fiebre, derrame seroso en el sistema circulatorio y respiratorio, y hemorragia en diversos órganos y tejidos (Mellor, et al., 2000). Consecuentemente, esta enfermedad causa una mortalidad mayor al 90%, lo que la convierte en una de las enfermedades más letales en équidos (Linton, et al., 2002; Ninio, 2011).

El virus de la PEA es un virus de ARN de doble cadena sin envoltura, de un diámetro aproximado de 60-80 nm, perteneciente a la familia Reoviridae, género *Orbivirus* (Pagès & Sarto i Monteys, 2005). Actualmente existen 9 serotipos, pero limitados a África Subsahariana (Connelly, 2005; Nolan, et al., 2007).

1.6. Fiebre catarral ovina (FCO)

La fiebre catarral ovina (FCO), también conocida como lengua azul, es una enfermedad viral que afecta a bovinos, caprinos, ovinos, y rumiantes salvajes (MacLachlan, 1994; Lehmann, et al., 2012). Esta se transmite entre sus hospedadores por la picadura de algunas especies del género *Culicoides* (Mellor, et al., 2000; Augot, et al., 2010). La mayoría de especies vectoras han sido comprobadas.

Los signos clínicos de la enfermedad son disnea, fiebre, congestión, inflamación y ulceración de las mucosas bucales y nasales, debilidad muscular, neumonía secundaria y

finalmente muerte (Tanya, et al., 1992; Tabachnick, 1996). Además, existe la formación de un edema facial, especialmente en los labios, lengua, boca y en el espacio submandibular (Lager, 2004).

En bovinos y rumiantes salvajes, los signos clínicos rara vez se manifiestan, pero éstos sirven como reservorios del virus (Tabachnick, 1996; Darpel, et al., 2011). En ovinos, los signos clínicos son más graves y causan una mortalidad mayor al 75%, mientras que en bovinos y caprinos causan morbilidad que afecta principalmente a la reproducción (Linton, et al., 2002; Borkent & Spinelli, 2007). En hembras gestantes, la FCO produce placentitis, abortos y malformaciones congénitas, mientras que en machos produce infertilidad temporal (Escandon, 2011).

El virus de la lengua azul, de ahora en adelante simplemente como VLA, es un virus de ARN de doble cadena sin envoltura, de un diámetro aproximado de 69 nm, perteneciente a la familia Reoviridae, género *Orbivirus* (Mellor, et al., 2000; Perrin, et al., 2006). Actualmente, existen 24 serotipos distribuidos mundialmente (Gorman, 1989; Muñoz, et al., 2011).

Las pérdidas económicas causadas por la FCO, son directas e indirectas. Las directas son descensos en la producción y en menor medida, salud y mortalidad del animal, pero son insignificantes en comparación con las pérdidas indirectas. Estas son restricciones comerciales impuestas entre zonas endémicas y zonas libres de VLA, y medidas de control como vacunación y diagnóstico. Por lo tanto, la FCO es una de las enfermedades económicamente más importantes transmitidas por el género *Culicoides* (Pagès, et al., 2009; Ninio, 2011).

1.7. Culicoides como vectores de VLA

Actualmente, VLA es transmitido por alrededor de 30 especies, es decir por menos del 1% de especies del género *Culicoides* (Goffredo & Meiswinkel, 2004; Borkent & Spinelli, 2007). El éxito de este género como vectores se debe principalmente al gran tamaño que las poblaciones pueden alcanzar con los factores climáticos y medios de dispersión adecuados (Mellor, et al., 2000).

La distribución de VLA es prácticamente mundial, aproximadamente entre latitudes de 40°N y 35°S (Figura 3) (Tabachnick, 1996; MacLachlan, et al., 2009). No obstante, la distribución dependerá principalmente de la presencia y abundancia del vector (Cêtre-Sossah, et al., 2004; Pagès & Sarto i Monteys, 2005). Por lo tanto, el vector de VLA será diferente en cada sitio.

En África, el principal vector de VLA es *C. imicola*, cuya distribución comprende casi toda África, y regiones adyacentes como España, Portugal, Grecia, Chipre, Israel, Turquía, Yemen y Omán. No obstante, en áreas frías o áridas de África, el principal vector de VLA es *C. bolitinos* (Mellor, et al., 2000; Cêtre-Sossah, et al., 2004; Ayllón, et al., 2014).

Por un lado, en la Cuenca Mediterránea, al igual que en España, los principales vectores de VLA son nuevamente *C. imicola* y *C. obsoletus*, pero el primero causa al menos el 90% de la transmisión de la enfermedad en esta área (Calvo, et al., 2009; Alarcón & Lucientes, 2012). En Europa del Norte, *C. imicola* está ausente o es muy rara, por lo que los principales vectores son *C. obsoletus* y *C. pulicaris* (Meiswinkel, et al., 2007; Nolan, et al., 2007).

Los principales vectores de VLA en Australia son *C. actoni*, *C. brevitarsis*, *C. fulvus* y *C. wadai* (Mellor, et al., 2000). En Asia, se aisló VLA sin identificar la especie vectora, pero debido a la presencia de importantes vectores en el continente, se considera a *C. imicola*, además de *C. actoni*, *C. brevitarsis*, *C. fulvus* y *C. wadi* como posibles vectores (Ninio, 2011).

C. imicola es un importante vector de VLA a nivel mundial, pero está ausente en el Nuevo Mundo (Mellor, et al., 2000). En América del Norte, con excepción de Florida, los principales vectores de VLA son *C. sonorensis* y *C. variipennis* (Kramer, et al., 1985; Holbrook, et al., 1996). En el resto de América, estas especies están ausentes, pero también ocurre la FCO, por lo que en Florida, América Central y el Caribe, los principales vectores son *C. insignis* y *C. pusillus* (Kramer, et al., 1985; Tanya, et al., 1992). En América del Sur existe poca información disponible, por lo que se desconoce el principal vector de VLA, pero debido a la presencia de importantes vectores en el continente, se considera a *C. insignis*, además de *C. filarifer* y *C. pusillus* como posibles vectores (Lager, 2004; Borkent & Spinelli, 2007).

VLA ha sido aislado con más frecuencia de otros grupos de artrópodos, por lo que la asociación con los culicoides es probablemente incidental (Mellor, et al., 2000). Estos se infectan con arbovirus sólo al alimentarse de sangre de animales infectados, por lo que nunca nacen infectados (Tanya, et al., 1992). Una vez infectado, este permanece infectado toda su vida, es decir, hasta 70 días (Escandon, 2011; Mayo, et al., 2014).

VLA se adhiere a la superficie luminal de las células intestinales, probablemente por penetración directa de la membrana o endocitosis mediada por receptor, donde posterior-

mente se replica (Tabachnick, 1996). Las partículas virales escapan a través de la membrana basolateral de las células intestinales hacia el hemocele donde infectan una amplia gama de órganos secundarios, incluyendo las glándulas salivales, donde están disponibles para la transmisión (Mellor, et al., 2000; Mullens, et al., 2004).

1.8. *Culicoides insignis* como parte del subgénero *Hoffmania*

El subgénero *Hoffmania* fue descrito por Irving Fox en 1948. En un inicio, este subgénero fue erigido para 12 especies de América Central que diferían del resto de subgéneros, pero con el tiempo, se añadieron especies de África y Asia. Actualmente, según Bor-kent (2012a), el subgénero *Hoffmania* está compuesto por 80 especies, de las cuales, 32 se encuentran en América.

Culicoides insignis fue descrita por Adolfo Lutz en 1913. Esta es una especie neotropical perteneciente al subgénero *Hoffmania* de 1,5 mm de longitud y 0,6 mm de ancho en fase adulta (Fox, 1948; Forattini, 1957). La distribución geográfica de esta especie es regional, restringida a zonas cálidas, desde Florida hasta Argentina (Figura 4) (Wirth & Blanton, 1974; Felipe-Bauer, et al., 2008).

La principal característica de *C. insignis* es un patrón de alas donde la vena R-M está fuertemente pigmentada de modo continuo hasta el área clara en la celda r2 y un área oscura fuertemente pigmentada en la celda r1 (Fox, 1948; Perruolo, 2009). Además, posee un área clara en la celda m1 que no alcanza la costa, pero que es atravesada por la vena M2 (Wirth & Blanton, 1956b; Forattini, 1957). Cerca del borde de las celdas m1, m2 y cu, existe pequeñas áreas claras definidas, mientras que en la celda m y anal, existe áreas claras indefinidas.

El tamaño de las alas de *C. insignis* varía según el sexo. En hembras, este es $1,16 \pm 0,054$ mm y en machos $1,08 \pm 0,048$ mm (Kramer, et al., 1985). No obstante, algunos autores no diferencian por sexo, y el tamaño es $1,11 \text{ mm} \pm 0,050$ mm (Wirth & Blanton, 1956b; Brickle & Hagan, 1999).

1.9. Análisis molecular y alométrico

Actualmente, el ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN ribosomal (ADNr) son marcadores moleculares ampliamente utilizados en el estudio de la evolución de dípteros hematófagos como los del género *Culicoides* (Hoy, 2013; Slama, et al., 2014).

El ADNmt es un marcador molecular útil en la filogenética, filogeografía y genética de poblaciones (Augot & Depaquit, 2010; Slama, et al., 2014). Se lo utiliza principalmente porque se conoce ampliamente sus propiedades estructurales y evolucionarias, además que

funciona bien y universalmente en la clase Insecta, desde insectos primitivos sin alas hasta insectos con alas (Zhang & Hewitt, 1997; Linton, et al., 2002).

El gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) es un marcador genético útil para diferenciar inequívocamente especies del género *Culicoides*, especialmente especies hermanas o crípticas que son morfológicamente idénticas o casi idénticas (Martínez de la Puente, et al., 2012; Ander, et al., 2013). Además es útil para identificar la variación intraespecífica.

Las ventajas de COI son fácil aislamiento, herencia materna, alto número de copias, ausencia de recombinación y mayor tasa de mutación que el ADNn (Lunt, et al., 1996; Ander, et al., 2013; Kato, et al., 2014). Actualmente, existen más de 30 combinaciones de primers que dan como resultado fragmentos de distintos tamaños, desde 20 hasta 1630 pb (Zhang & Hewitt, 1997).

El ADNr es un marcador molecular útil en la filogenética (Friedrich & Tautz, 1997). Este está compuesto por dominios divergentes de rápida evolución (D) intercalados entre dominios conservados (C), en cientos de unidades repetidas en tándem, cada uno de los cuales contiene las subunidades 18S, 5.8S y 28S (Cêtre-Sossah, et al., 2004; Matsumoto, et al., 2009; Slama, et al., 2014).

El dominio D1-D2 del gen ribosomal 28S es un marcador genético útil para diferenciar inequívocamente especies y subgéneros del género *Culicoides* (Friedrich & Tautz, 1997). Además es útil para identificar el tiempo de surgimiento de los taxones debido a que posee distintas tasas de acumulación de mutaciones por lo que ha retenido información filogenética (Slama, et al., 2014).

Por otro lado, sólo taxonomistas especializados puede identificar especies del género *Culicoides* morfológicamente idénticas o casi idénticas (Wirth, et al., 1988; Rawlings, 1996; Ander, et al., 2013). La morfometría es una potente y barata herramienta basada en análisis estadísticos multivariados útiles para cuantificar la variación fenotípica e identificar un organismo (Dujardin & Slice, 2007; Muñoz, et al., 2011).

La alometría es una técnica morfométrica que mide el tamaño de un organismo (Dujardin, et al., 2010). Los landmarks (LM) son puntos anatómicos relativos en coordenadas que proporcionan las medidas del tamaño de un organismo (Dujardin, et al., 2010). Actualmente, no existe una traducción exacta de esta palabra, por lo que se utilizará igualmente el término “landmark”.

Finalmente, según la OIE (2014), no se ha reportado ningún caso de FCO en el Ecuador (Figura 5 y Tabla 1). Sin embargo, López, et al. (1985), Mantilla (1998) y Merino (2011), reportaron la presencia de anticuerpos para VLA en ganado ovino, bovino y caprino tanto en la Región Costa como Sierra (Figura 6). Por lo tanto, la enfermedad podría estar circulando por el país, pero se desconoce la especie vectora que la transmite. Este estudio pretende estudiar mediante marcadores moleculares y alometría la variación intra-específica de especímenes de *C. insignis* procedentes de Bolívar, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha con el fin de identificar la posibilidad de esta especie de transmitir VLA en el país.

2. Justificación

Gualapuro (2013) reportó por primera vez a *C. insignis* en el Ecuador. La distribución geográfica de esta especie es regional, restringida a zonas cálidas, desde Florida hasta Argentina (Wirth & Blanton, 1974; Felipe-Bauer, et al., 2008). La importancia de *C. insignis* radica en que permite la replicación y transmisión de VLA serotipos 2 y 11 a ruminantes domésticos, por lo que es considerado el principal vector de VLA en Florida, América Central y el Caribe (Tanya, et al., 1992).

En el Ecuador se desconoce el rol del género *Culicoides* como vectores de enfermedades de importancia veterinaria como la FCO. Según la OIE (2014), en el país no se ha reportado ningún caso de esta enfermedad, pero varios estudios han reportado la presencia de anticuerpos para VLA en ganado ovino, bovino y caprino tanto en la Región Costa como Sierra (López, et al., 1985; Mantilla, 1998; Merino, 2011).

La FCO podría estar circulando por el país, pero se desconoce la especie vectora que la transmite. En América del Sur existe poca información disponible, pero debido a la presencia de un importante vector en el continente, se sospecha que *C. insignis* es posible vector de VLA (Lager, 2004). Por lo tanto, un estudio molecular y alométrico de *C. insignis* permitirá conocer la variación intraespecífica, además de la posibilidad de esta especie de transmitir VLA en el país.

La identificación de especies del género *Culicoides* basada en la fenética es difícil incluso para taxonomistas especializados (Pagès, et al., 2009). Esto se debe a que se requiere sólidos conocimientos de la morfología de estos dípteros, especialmente del patrón de alas (Nolan, et al., 2007; Lehmann, et al., 2012). Incluso cuando se cumple con estos conocimientos, especies hermanas o crípticas pueden ser indistinguibles.

La variación morfológica de *C. insignis* permite intuir que es un grupo de especies (Wirth, et al., 1988). En el género *Culicoides*, varias especies involucradas en la transmisión de VLA ocurren dentro de grupo de especies (Pagès, et al., 2009). Por lo tanto, un estudio molecular también permitirá conocer si *C. insignis* es un grupo de especies y la relación filogenética de esta especie con otras especies del subgénero *Hoffmania*, al cual actualmente pertenece.

Los resultados de este estudio contribuirán al conocimiento morfológico y molecular de *C. insignis* del Ecuador. Además, este estudio constituye el primer paso para la identificación de posibles vectores de VLA en el país, el cual debe ser complementado posteriormente con la detección del virus en la especie vectora y en animales con sintomatología sugestiva.

3. Área de estudio

Los especímenes analizados en este estudio provienen de diferentes colecciones entomológicas realizadas en siete localidades de cuatro provincias del Ecuador (Figura 7 y Tabla 2). Entre marzo y abril de 2011, se capturó especímenes en Pichincha (Pacto y Puerto Quito) e Imbabura (Cachaco). Entre febrero y marzo de 2013, se capturó en Bolívar (Cacuma y Echeandía), Pichincha (Paraíso Escondido) y Esmeraldas (Sto. Domingo de Onzole). Cabe mencionar que estas localidades pertenecen a la Región Costa y parte baja de la Región Sierra con ecosistema de bosque secundario y altitud que varía entre 200 y 1500 msnm.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Determinar la diversidad genética de especímenes de *C. insignis* procedentes de cuatro provincias del Ecuador mediante el análisis del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI).

4.2. Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente especímenes de *C. insignis* procedentes de siete localidades del Ecuador mediante el uso de claves taxonómicas.
- Analizar las secuencias de COI y D1-D2 de especímenes de *C. insignis* del Ecuador.
- Analizar la alometría del patrón de alas de especímenes de *C. insignis* del Ecuador.
- Analizar las secuencias de D1-D2 de especies del subgénero *Hoffmania* al cual actualmente pertenece *C. insignis*.

5. Materiales

5.1. Identificación morfológica de especímenes

- Alcohol al 70%.
- Pinza entomológica.
- Pipeta desechable.
- Tubos para almacenamiento de muestras de 5 ml.
- Estereomicroscopio Leica EZ4.

5.2. Montaje de especímenes

- Alcohol al 70%.
- Goma cloral (hidrato de cloral al 30%, goma arábica al 20% y glicerina al 13%).
- Solución Marc André (hidrato de cloral al 40% y ácido acético al 30%).
- Agujas hipodérmicas desechables.
- Pinza entomológica.
- Pipeta desechable.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Tubos Axygen MCT-175-C de 1,7 ml.
- Estereomicroscopio Leica EZ4.

5.3. Extracción de ADN

- Kit Qiagen “AllPrep DNA/RNA”.
- Buffer TE (10mM Tris-HCl y 0,1mM EDTA).
- CTAB (CTAB 2% p/v, NaCl 1,4M, 100mM HCl y 20mM EDTA).
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1).
- Etanol al 100%.
- Etanol al 70%.
- Proteinasa K.
- Pistilos.
- Tubos Axygen MCT-175-C de 1,7 ml.
- Baño de arena Thermolyne.
- Centrifuga Eppendorf 5415 D.
- Vortex Mixer Labnet.

5.4. Amplificación de ADN

- H₂O de PCR.

- Buffer [5X] Promega.
- MgCl₂ [25mM].
- dNTPs [2mM].
- Primer Lep F [50μM]: 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3' (Slama, et al., 2014).
- Primer Lep R [50μM]: 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3' (Slama, et al., 2014).
- Primer D1 [50μM]: 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3' (Hadj Henni, et al., 2014).
- Primer D2 [50μM]: 5'-TCCGTGTTTCAAGACGGG-3' (Hadj Henni, et al., 2014).
- Taq polimerasa.
- Tubos PCR-02-C de 0,2 ml.
- Tubos PCR-05-C de 0,5 ml.
- Microcentrífuga Labnet PCR.
- Termociclador Bio-Rad T100™ Thermal Cycler.
- Vortex Mixer Labnet.

5.5. Electroforesis

- Agarosa.
- Bromuro de etidio.
- TBE [10X].
- Cámara de electroforesis C.B.C. Scientific Co. Model: MGO-502T.
- Microondas Whirlpool.

5.6. Secuenciamiento

- 20 μl de productos de PCR de Lep F y Lep R.
- 20 μl de productos de PCR de D1 y D2.

5.7. Análisis molecular

- Programa PreGap 1.6 y Gap 4.11.2.
- Programa Bioedit Sequence Aligment Editor.
- Programa Mega 5.05.

5.8. Análisis alométrico

- Programa Clic 64.
- Cámara Leica.
- Microscopio Leica DME.

6. Métodos

6.1. Colección de especímenes

Se analizó un total de 3310 especímenes del género *Culicoides* capturados en cuatro provincias del Ecuador entre los años 2011 y 2013. Estos se encontraban conservados en el Laboratorio de Entomología Médica y Medicina Tropical de la Universidad San Francisco de Quito a 4°C en tubos de almacenamiento de muestras de 2 ml con alcohol al 70% debidamente etiquetados y tapados con algodón.

6.2. Identificación morfológica de especímenes

La identificación morfológica de especímenes de *C. insignis* se llevó a cabo con la ayuda del estereomicroscopio a baja magnificación (16-20x). Se colocó especímenes del género *Culicoides* previamente separados en un plato Petri con alcohol al 70% y se separó según el patrón de alas de *C. insignis* (Wirth, et al., 1988). Además se identificó morfológicamente hembras y machos según los genitales y antenas (Forattini, 1957). Los especímenes de *C. insignis* se almacenaron a -20°C en tubos de almacenamiento de muestras de 2 ml con alcohol al 70% debidamente etiquetados y tapados con algodón hasta su posterior uso.

6.3. Montaje de especímenes

El montaje de especímenes identificados morfológicamente como *C. insignis* se llevó a cabo con la ayuda del estereoscopio a alta magnificación. Se colocó el espécimen en un extremo del portaobjetos con una gota de alcohol al 70% y con la ayuda de dos agujas estériles desechables se procedió a separar la cabeza, alas y tres últimos segmentos del abdomen. La parte restante del abdomen, tórax y extremidades se depositó en un tubo de 1,7 ml estéril y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso. En otro portaobjetos, se puso una gota de la solución Marc André, se colocó la cabeza y tres últimos segmentos del abdomen y se calentó por 5 segundos. Se puso una gota de goma cloral en el portaobjetos inicial y se colocó en la posición correcta la cabeza, alas y tres últimos segmentos del abdomen y se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente por alrededor de dos semanas.

6.4. Extracción de ADN

En el género *Culicoides*, solo las hembras son reservorios y vectores de nemátodos, protozoos y virus (Glick, 1990; Muñoz, et al., 2011; Ayllón, et al., 2014). Consecuentemente, según el sexo, se utilizó dos métodos de extracción de ADN.

La extracción de ADN de hembras se llevó a cabo con el kit “AllPrep DNA/RNA” de Qiagen siguiendo el protocolo del fabricante. Éste kit permite la purificación simultánea de ADN genómico y ARN total de una misma muestra biológica. El ADN se purificó con la ayuda de la columna “AllPrep DNA mini spin” de color transparente, mientras que el ARN con la columna “RNeasy mini spin” de color rosado.

Se añadió 30 µl de buffer RLT Plus al tubo de 1,7 ml que contenía el abdomen del espécimen de *C. insignis* y se lo trituró con la ayuda de un pistilo. Se lavó el pistilo con 320 µl de buffer RLT Plus y se centrifugó durante 3 minutos a 16300 *xg*. Se transfirió directamente la muestra a una columna “AllPrep DNA mini spin” con un tubo de recogida de 2 ml y se centrifugó durante 30 segundos a 8944 *xg*. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recogida de 2 ml y se almacenó a temperatura ambiente (15-25°C).

Se añadió 500 µl de buffer AW1 directamente a la columna “AllPrep DNA mini spin”, se centrifugó durante 15 segundos a 8944 *xg* y se descartó el filtrado. Se añadió 500 µl de buffer AW2, se centrifugó durante 2 minutos a 16300 *xg* y se descartó el filtrado con el tubo de recogida de 2 ml. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml, se añadió 30 µl de buffer EB, se almacenó a temperatura ambiente (15-25°C) y se centrifugó durante 1 minuto a 8944 *xg*. Finalmente, se añadió 20 µl de buffer EB y nuevamente se centrifugó durante 1 minuto a 8944 *xg*. Se obtuvo un volumen final de 50µl y se lo almacenó a -20°C.

La extracción de ADN de machos se llevó a cabo con el protocolo de extracción de ADN genómico CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). Ésta se dividió en dos etapas, día uno y dos.

En el día uno, se añadió 20 µl de CTAB al tubo de 1,7 ml que contenía el abdomen del espécimen de *C. insignis* y se lo trituró con la ayuda de un pistilo. Se lavó el pistilo con 680 µl de CTAB. Se añadió 20 µl de proteinasa K y se incubó en baño de arena a 65°C por 2 horas, agitando la muestra cada 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente (15-25°C). Se añadió 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló vigorosamente por inversión hasta formar una emulsión y se centrifugó durante 10 minutos a 12879 *xg*. Se transfirió 500 µl de la fase superior a un nuevo tubo de 1,7 ml, sin tocar la interfase para evitar contaminación. Se añadió 1 ml de etanol al 100% a -20°C, se mezcló por inversión y se conservó a -20°C toda la noche.

En el día dos, se centrifugó durante 10 minutos a 17530 *xg* y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de etanol al 70% y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 10

minutos a 16300 $\times g$ y se descartó el sobrenadante. Se dejó el tubo boca abajo sobre papel absorbente durante 15-20 minutos. Finalmente, se agregó 50 μl de buffer TE. Se obtuvo un volumen final de 50 μl y se lo almacenó -20°C .

6.5. Amplificación de ADN

Se realizó la amplificación del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) y dominio D1-D2 del gen ribosomal 28S (D1-D2).

En la amplificación de COI, se utilizó los primers Lep F y Lep R (Anexo 1). Se amplificó COI de 41 especímenes de *C. insignis* y uno de *C. fernandoi* (Figura 8). Para una reacción de 50 μl , se utilizó 1X de buffer; 0,20mM de dNTPs; 1,80mM de MgCl_2 ; 1 μM de Lep F; 1 μM de Lep R; y 0,15U/ μl de Go Taq promega (Anexo 2). Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; 4 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anidamiento a 45°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto; 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anidamiento a 51°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto; y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos (Anexo 3).

En la amplificación de D1-D2, se utilizó los primers D1 y D2 (Anexo 1). Se amplificó D1-D2 de 19 especímenes de *C. insignis*, de los cuales, 5 fueron de Bolívar (2 localidades); 3 de Esmeraldas (1 localidad); 4 de Imbabura (1 localidad); y 6 de Pichincha (3 localidades, y de 7 especies del subgénero *Hoffmania* (*C. batesi*, *C. diabolicus*, *C. fernandoi*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. guttatus*, *C. ocumarensis*) y uno del subgénero *Avaritia* (*C. pusillus*) (Figura 9). Para una reacción de 50 μl , se utilizó 1X de buffer; 0,2mM de dNTPs; 2mM de MgCl_2 ; 1 μM de D1; 1 μM de D2; y 0,09U/ μl de Go Taq promega (Anexo 4). Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; 39 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anidamiento a 58°C por 1:30 minutos, extensión a 68°C por 1 minuto; y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos (Anexo 5).

6.6. Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa al 1,5% y bromuro de etidio al 0,15%. Se armó correctamente la cámara de electroforesis, se depositó la mezcla y de acuerdo al número de muestras, se colocó los pozuelos. Finalmente se cargó 4 μl de productos de PCR y se corrió por 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se visualizó los productos de PCR bajo luz UV.

6.7. Secuenciamiento

Se secuenció en ambas direcciones 26 µl de productos de PCR de COI, y 26 µl de productos de PCR de D1-D2, en Beckman Coulter Genomics Inc., Inglaterra.

6.8. Análisis molecular

Se corrigió las secuencias obtenidas de COI y D1-D2 con los programas Pregap 1.6. y Gap 4.11.2. contenidos en el paquete Staden. Posteriormente, se las alineó con 14 secuencias de COI y 14 de D1-D2 de la Isla de Guadalupe (Antillas Menores) proporcionadas por Denis Augot, con el programa Bioedit Sequence Aligment Editor. Finalmente, se generó un árbol filogenético por el método de Maximum-Likelihood (ML) con el programa Mega 5.05.

6.9. Análisis alométrico

Se tomó las fotografías en una sola dimensión (3x) de las dos alas de 32 hembras de *C. insignis* y de una sola ala de 4 hembras. Se excluyó a los machos de este estudio debido al dimorfismo sexual. Se recolectó 10 landmarks de cada ala por triplicado con el programa Clic 64 (Figura 10). Se calculó el promedio de las repeticiones y de cada individuo. Finalmente, se generó un análisis discriminativo (DA).

7. Resultados

7.1. Colecciones de especímenes analizadas

Se analizó un total de 3310 especímenes del género *Culicoides* capturados en cuatro provincias del Ecuador entre los años 2011 y 2013. En Bolívar se capturó 1117 especímenes; en Esmeraldas 883; en Imbabura 122; y en Pichincha 1188. Además, se analizó un total de 3085 especímenes capturados en Orellana, pero no se encontró ningún ejemplar de *C. insignis*.

7.2. Identificación morfológica de especímenes

Mediante el uso de claves morfológicas, se identificó a 41 especímenes de *C. insignis*, de los cuales, 36 fueron hembras (88%) y 5 machos (12%) (Tabla 3). En Bolívar se capturó 6 especímenes (15%); en Esmeraldas 14 (34%); en Imbabura 12 (29%); y en Pichincha 9 (23%) (Figura 11). Además, se identificó a un espécimen de *C. fernandoi* en Imbabura.

7.3. Amplificación de ADN

Se amplificó COI de 41 especímenes identificados morfológicamente como *C. insignis*, además de un espécimen identificado como *C. fernandoi*. Se obtuvo la amplificación

exitosa de todos los especímenes con bandas de un tamaño aproximado de 633 pb (Figura 12).

Adicionalmente, se amplificó D1-D2 de 19 especímenes identificados morfológicamente como *C. insignis*, y de 7 especies del subgénero *Hoffmania* (*C. batesi*, *C. diabolicus*, *C. fernandoi*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. guttatus*, *C. ocumarensis*) y uno del subgénero *Avaritia* (*C. pusillus*). Se obtuvo la amplificación exitosa de todos los especímenes con bandas de un tamaño aproximado de 686 pb (Figura 13).

7.4. Análisis molecular del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI)

El promedio de los porcentajes de la composición nucleotídica fue de 38,0% de T; 28,7% de A; 18,6% de C y 14,7% de G. Todos los amplicones presentaron 64 sitios variables (14,8%) y 20 sitios informativos (4,6%) (Tabla 4). Las sustituciones encontradas en estos últimos sitios fueron sinónimas y presentaron un mayor porcentaje de transversión (cambios de C a T o viceversa) (52,9%) que transición (cambios de A a G o viceversa) (47,1%).

Cabe mencionar que se incluyó 14 secuencias de COI de *C. insignis* procedentes de la Isla de Guadalupe (Antillas Menores) proporcionadas por Denis Augot. El árbol filogenético ML obtenido muestra que todos los especímenes de *C. insignis* procedentes de Ecuador se agrupan en un solo clado y se separan de sus semejantes de la Isla de Guadalupe, los cuales se agrupan en otro clado (Figura 14). Además muestra que los especímenes de *C. insignis* del Ecuador procedentes de las provincias de Bolívar, Esmeraldas, Imbabura, y Pichincha, se agrupan a su vez en tres clados. Finalmente, se encontró 7 haplotipos para COI de especímenes de *C. insignis* del Ecuador (Tabla 4).

7.5. Análisis molecular del dominio D1-D2 del gen ribosomal 28S

El promedio de los porcentajes de la composición nucleotídica fue de 29,7% de T; 29,6% de A; 16,1% de C y 24,6% de G. Todos los amplicones presentaron 55 sitios variables (8,0%) y 17 sitios informativos (2,5%) (Tabla 5). Las sustituciones encontradas en estos últimos sitios fueron sinónimas y presentaron porcentajes idénticos de transversión (cambios de C a T o viceversa) (50,0%) y transición (cambios de A a G o viceversa) (50,0%). Además, se observó dos deleciones en *C. guttatus* en los sitios 480 y 481, y ninguna deleción ni inserción en el resto de especies del subgénero *Hoffmania*.

Cabe mencionar que se incluyó 14 secuencias de D1-D2 de *C. insignis* procedentes de la Isla de Guadalupe (Antillas Menores) proporcionadas por Denis Augot. El árbol filogenético ML obtenido muestra un solo clado formado por las especies del subgénero

Hoffmania y otro del subgénero *Avaritia* (Figura 15). Además se observa un clado de especímenes de *C. insignis* procedentes de Ecuador e Isla de Guadalupe y 7 clados más que incluyen individuos de *C. batesi*, *C. diabolicus*, *C. fernandoi*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. guttatus*, y *C. ocumarensis*. Finalmente, se encontró 7 haplotipos para D1-D2 de especímenes de *C. insignis* tanto del Ecuador como Isla de Guadalupe (Tabla 5).

7.8. Análisis alométrico

El análisis discriminativo (DA) obtenido de hembras de *C. insignis* muestra semejanzas entre las localidades de Caluma (Bolívar), Echeandía (Bolívar), Sto. Domingo de Onzole (Esmeraldas), Cachaco (Imbabura), Pacto (Pichincha) y Paraíso Escondido (Pichincha) (Figura 16). La localidad de Puerto Quito (Pichincha), muestra mayor diferencia comparado con el resto de localidades.

8. Discusión

8.1. Identificación morfológica de especímenes de *C. insignis*

Las alas son útiles en la identificación morfológica de especies del género *Culicoides* debido a la alta variabilidad en el patrón de pigmentación (Muñoz, et al., 2011). La mayoría de especies posee un patrón de alas característico, pero existe especies hermanas o crípticas cuyos patrones de alas son idénticos o casi idénticos (Wirth, et al., 1988; Rawlings, 1996; Ander, et al., 2013).

En el presente estudio, se identificó morfológicamente a *C. insignis* y *C. fernandoi* bajo un patrón de alas casi idéntico. La identificación morfológica de estas especies es difícil debido a discrepancias en el área clara de la celda r5. Por un lado, según Perruolo (2009), en *C. fernandoi* existe dos áreas claras, mientras que en *C. insignis* existe únicamente un área clara. Por otro lado, según Forattini (1957), es en esta última especie donde existe dos áreas claras.

La identificación morfológica errónea o imprecisa de posibles vectores, como *C. insignis*, tiene importantes implicaciones biológicas, ecológicas y epidemiológicas (Ogedengbe, et al., 2011; Ander, et al., 2013). Esta principalmente influye en los programas de control y vigilancia de vectores, así como también en el análisis de riesgo de la enfermedad (Muñoz, et al., 2011; Lassen, et al., 2012).

En el caso de *C. insignis* y *C. fernandoi*, las características principales que se observaron en este estudio para la identificación morfológica precisa, son dos áreas claras en *C. fernandoi* y un área clara en *C. insignis*, tanto en la celda r5 como m1 (Figura 17). De esta

manera, se identificó morfológicamente a 41 especímenes como *C. insignis* y un espécimen como *C. fernandoi*.

La proporción de *C. insignis* fue 88% hembras y 12% machos (Tabla 3). El estudio de Florêncio, et al. (2010) corrobora esta proporción, ya que en él se capturó un mayor número de hembras. Esto probablemente se deba a que las hembras del género *Culicoides* son más activas y vuelan en búsqueda de ingesta sangre, pareja, o sitio de ovoposición, mientras que los machos únicamente vuelan en búsqueda de néctar (Lopes & De Sousa, 2010). Además, probablemente los sitios de colección se encontraban lejos de los hábitats larvarios como el barro, donde normalmente reposan los machos de *C. insignis* (Linley, 1965; Kramer, et al., 1985).

8.2. Ausencia de *C. insignis* en Tiputini

La ausencia de *C. insignis* en colecciones entomológicas realizadas en Tiputini, Orellana (Región Amazónica) en los años 2011 y 2013, podría indicar preferencias tróficas. Estudios realizados en Argentina y Paraguay, indican que *C. insignis* se alimenta principalmente de sangre de humano y ganado (Linley, 1965; Ronderos, et al., 2003). Tiputini es un bosque primario no intervenido carente de actividades humanas como la ganadería. Además, podría indicar que la Cordillera de Los Andes constituye una barrera geográfica que influye en la circulación de vientos, por lo tanto, también en el flujo de genes entre poblaciones de una misma especie (Gan & Rao, 1994; Flores, 2007; Burneo, 2009).

8.3. Análisis de la variabilidad genética de *C. insignis* mediante COI

8.3.1. Poblaciones definidas de *C. insignis* del Ecuador e Isla de Guadalupe

El gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) es un gen de rápida evolución, útil en estudios poblacionales dentro de una misma especie (Rebolledo, et al., 2013). Este permite identificar patrones de flujo genético y reproductivo en artrópodos vectores (Quiñonez, 2011; Kato, et al., 2014).

El árbol filogenético ML obtenido a partir de COI muestra que todos los especímenes de *C. insignis* procedentes del Ecuador se agrupan en un solo clado y se separan de sus semejantes de la Isla de Guadalupe (Antillas Menores), los cuales se agrupan en otro clado (Figura 14). La separación de estos especímenes se apoya por valores de bootstrap altos (>79%) y muestra la existencia de dos poblaciones definidas, una de Ecuador y otra de Isla de Guadalupe.

En el género *Culicoides* se ha observado que individuos de la misma especie que se encuentran separados por distancias geográficas, tienden a formar poblaciones distintas

(Hebert, et al., 2009). La existencia de estas poblaciones se podría explicar por la distancia geográfica entre Ecuador e Isla de Guadalupe. Ecuador está ubicado en América del Sur (dentro del continente) e Isla de Guadalupe en las Antillas Menores (fuera del continente), con una distancia aproximada de 2740 kilómetros.

Esta tendencia se corrobora con otros estudios poblacionales en especies del género *Culicoides*, por ejemplo Ander et al. (2013) confirma la existencia de dos poblaciones de *C. lupicaris*, una de España y otra de Suecia. De igual manera, Slama et al. (2014) confirma la existencia de dos grandes poblaciones de *C. imicola*, una que incluyó especímenes de Sudáfrica, Algeria, Portugal, Italia y Grecia; y otra de especímenes de España e Israel.

8.3.2. Baja variabilidad intraespecífica de *C. insignis* del Ecuador

El mismo árbol filogenético ML obtenido a partir de COI muestra que los especímenes de *C. insignis* del Ecuador procedentes de las provincias de Bolívar, Esmeraldas, Imbabura, y Pichincha, se agrupan a su vez en tres clados (Figura 14). La separación de estos especímenes se apoya por valores de bootstrap bajos (<73%) y muestra la existencia de tres poblaciones del Ecuador que no están bien definidas, sin distinción de los sitios geográficos donde fueron capturados.

La estructura poblacional se determina principalmente por la dispersión de especímenes lo que permite a su vez el flujo de genes. Se ha observado que especímenes con alta dispersión tienden a distribuirse ampliamente, por lo que poseen estructuras genéticas similares, mientras que especímenes con baja dispersión, tienden a aislarse geográfica y genéticamente (Donnelly, et al., 2002).

Los especímenes del género *Culicoides* son malos voladores, pero pueden ser dispersados de manera activa o pasiva por el viento (Mellor, et al., 2000; Ninio, 2011). Activamente se dispersan con el viento en vuelos generalmente cortos, donde la distancia media de vuelo en hembras es de dos kilómetros, mientras que en machos es la mitad de esa distancia (Connelly, 2005; Merino, 2011). Pasivamente se dejan dispersar por el viento a considerables distancias y altitudes, desde pocos hasta cientos de kilómetros (Forattini, 1957; Martínez de la Puente, et al., 2012). No obstante, la dispersión de especímenes viables dependerá de vientos con una velocidad no mayor a 35 km/h (Braverman & Chechik, 1996).

El viento no solo influye en la dispersión de especímenes, sino también en la propagación de enfermedades, por lo que solo se necesita de un espécimen infectado para iniciar un brote (Mellor, et al., 2000; Ninio, 2011). Un ejemplo es *C. imicola*, vector africano de VLA, que se dispersó pasivamente por el viento cientos de kilómetros hacia Europa y Asia,

transmitiendo VLA a zonas libres de la enfermedad (Biteau-Coroller, et al., 2006; Calvo, et al., 2009). Al igual que *C. imicola*, muchos vectores están experimentando expansión geográfica (Alarcón & Lucientes, 2012).

La ausencia de patrones geográficos en especímenes de *C. insignis* del Ecuador podría indicar que estos se están dispersando pasivamente por el viento desde una localidad del oeste hacia otra, reproduciéndose entre sí y permitiendo el flujo constante de genes. Este último actúa como una fuerza que mantiene integrada a la especie (Aguirre, 2007). Además, podría indicar que *C. insignis* es una especie con alta dispersión.

Los factores climáticos como temperatura, humedad y precipitación, también determinan la estructura poblacional del género *Culicoides* (Pili, et al., 2010). Éstos influyen en el número y desarrollo de larvas, supervivencia de adultos y disponibilidad de sitios de reproducción (Wirth & Blanton, 1974; Mullens, et al., 2004).

Las temperaturas altas influyen en el crecimiento de la población, mientras que temperaturas bajas influyen en la supervivencia de la población (Wittmann, et al., 2001). Por ejemplo, Holbrook et al. (1996) encontraron alto polimorfismo intraespecífico en especímenes de *C. variipennis variipennis* de seis estados de Nueva Inglaterra, Estados Unidos. El escaso flujo de genes se asoció a largos inviernos sin poblaciones adultas permanentes. Sin embargo, lo contrario encontraron en especímenes de *C. variipennis sonorensis* de California, Estados Unidos, asociando esto a cortos inviernos con poblaciones adultas permanentes. Asimismo, Wittmann et al. (2001) encontraron que *C. imicola* está presente en la Península Ibérica, a excepción de la parte norte donde la temperatura en invierno es considerablemente más baja.

El Ecuador posee una gran variedad de climas. En las localidades donde se desarrolló este estudio, el clima varía entre tropical-húmedo y templado, con períodos cortos de frío y/o sequía. Además, presentan condiciones favorables para el desarrollo del género *Culicoides* como son temperaturas que varían entre 15 y 35°C, humedad relativa mayor al 25%, y altitud de 0-1500 msnm (Braverman & Chechik, 1996).

En cuanto al ecosistema, los especímenes de *C. insignis* de este estudio se capturaron en bosque secundario, es decir, en ecosistemas alterados por el ser humano. Otros estudios como el de Wirth & Blanton (1959) y Veggiani, et al. (2011) corroboran esta información al encontrar especímenes de *C. insignis* cerca de zonas antropizadas como son la pastura para ganado y al borde de bosques. En el estudio de Kramer, et al. (1985), *C. insignis* cons-

tituyó el 99,9% de los culicoides capturados durante dos años en lugares cercanos a la crianza de ganado de engorde.

C. insignis es una especie activa durante todo el año, a excepción de periodos de frío intenso (Kramer, et al., 1985). Dado que en el Ecuador los periodos de frío son cortos, éstos podrían permitir la supervivencia exitosa de larvas y adultos. Además, factores climáticos similares, podrían permitir la adaptación exitosa de *C. insignis* en localidades del oeste del país en caso de dispersión. Como resultado, es probable que no existan largos periodos sin poblaciones adultas de *C. insignis* que puedan reproducirse entre sí.

8.3.3. Implicaciones como posible vector de VLA en el Ecuador

El conocimiento de la estructura poblacional de posibles vectores como *C. insignis*, permite identificar patrones de flujo genético y reproductivo (de Meeûs, et al., 2007; Quiñonez, 2011). Además, permite identificar la posibilidad de transmisión del virus entre diferentes poblaciones de la misma especie, incluso entre diferentes especímenes de la misma población (Calvo, et al., 2009; Ninio, 2011).

En el presente estudio, la distancia genética de *C. insignis* del oeste del Ecuador fue de 1,30%. En el estudio de Perrin et al. (2006), la distancia genética de *C. imicola* del Norte y Sur de la isla de Córcega fue de <1%. En ambos casos, la distancia genética es corta, lo que podría indicar una rápida y reciente expansión geográfica (Haro, et al., 2005; Calvo, et al., 2009).

Un factor genético que influye en la transmisión de VLA es la presencia o ausencia de barreras fisiológicas en el intestino (Ninio, 2011). Tabachnick (1996) observó el “intestino permeable” en *C. variipennis*, donde VLA es capaz de pasar directamente desde la sangre ingerida en el lumen del intestino hacia el hemocele, sin replicarse primero en las células intestinales. Una vez en el hemocele, VLA se replica e infecta una amplia gama de órganos secundarios, incluyendo las glándulas salivales. De esta manera, incluso especies vectoriales no habituales podrían transmitir VLA (Mellor, et al., 2000).

Otro factor genético que influye es la susceptibilidad oral (Mullens, et al., 2004; Carpenter, et al., 2006). En algunos casos, la saliva de los culicoides mejora la tasa de infección de VLA. Una de las proteínas más grandes de la cápside externa, VP2, puede ser escindida por proteasas como tripsina o quimotripsina, formando partículas subvirales infecciosas (ISVP). Darpel et al. (2011) encontraron que proteínas semejantes a la tripsina en la saliva de *C. sonorensis*, vector competente de VLA, permiten una unión más efectiva de VLA-VP2, que *C. nubeculosus*, vector menos competente de VLA.

C. insignis posee una tasa de infección de VLA del 20-62,5% (Tanya, et al., 1992). Sin embargo, no existen estudios que demuestren factores genéticos que mejoren esta tasa en *C. insignis*. En el Ecuador tampoco existe estudios de preferencias tróficas de *C. insignis*, pero como ya se mencionó anteriormente, varios estudios indican que se alimenta principalmente de sangre de humano y ganado (Linley, 1965; Ronderos, et al., 2003).

Por otro lado, varios estudios serológicos han determinado que VLA está extendida en América del Sur, generalmente sin enfermedad manifiesta (López, et al., 1985; Lager, 2004). En los años 2010-2014, la FCO ha sido confirmada en Argentina y Bolivia, sin enfermedad clínica (Tabla 1). En el Ecuador, López, et al. (1985), reportaron la presencia de anticuerpos para VLA en ganado de la provincia de El Oro, al igual que Mantilla (1998), quien también los reportó en bovinos y caprinos de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, El Oro y Guayas (Figura 6). Además, Merino (2011), reportó la presencia de anticuerpos para VLA en suero de ovinos de la parte baja de la provincia de Pichincha.

La FCO es una enfermedad más grave en ganado ovino que bovino restringida a áreas donde las especies vectoras están presentes (Tabachnick, 1996; Darpel, et al., 2011; Morag, et al., 2012). Por ejemplo en Australia, *C. brevitarsis* es considerado el vector más importante, pero *C. fulvus* el vector más eficiente. No obstante, este último ocurre en épocas con altas precipitaciones, lejos de áreas donde se crían ovejas, por lo que es incapaz de transmitir la enfermedad a este huésped (Mellor, et al., 2000). Consecuentemente en la FCO, es clave la interacción del vector, hospedador, virus y medio ambiente (Ninio, 2011).

En el caso del hospedador, según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en el Ecuador en el año 2013, el número de cabezas de ganado bovino y ovino fue mayor en la Región Sierra (Figura 18). En las cuatro provincias en estudio, se cría tanto ganado bovino como ovino (Figura 19). En Esmeraldas se capturó el mayor número de especímenes de *C. insignis* (34%), pero en esta provincia el número de cabezas de ganado bovino y ovino es menor que en las provincias de Pichincha y Bolívar. Por lo tanto, existe la presencia del posible vector, pero los hospederos están casi ausentes.

La altitud influye en la distribución geográfica de vectores, ya que estos no sobreviven en altitudes superiores a 1500 msnm (Merino, 2011). En este estudio, *C. insignis* se capturó en siete localidades que se encuentran en un rango de altitud entre 200 y 1500 msnm, lo que podría indicar que es una especie adaptada a medianas altitudes. Esto se corrobora con Veggiani, et al. (2011) y Gualapuro (2013) quienes también encontraron a *C.*

insignis en altitudes medianas, el primer estudio a una altitud de 414-468 msnm y el segundo a una altitud de 274 msnm.

El ganado ovino se cría principalmente en altitud, pero *C. insignis* podría ser una especie de altitudes medianas, por lo que otra especie podría ser vector de VLA en altitud. Colecciones entomológicas realizadas en Tambillo (3064 msnm) y Urkusiki (3400 msnm) muestran que la especie prevalente es *C. venezuelensis*, especie considerada no vector (Zapata, 2014, comunicación personal).

8.4. Análisis alométrico

El análisis discriminativo (DA) de las alas de 36 hembras de *C. insignis*, corrobora de cierta manera los resultados de COI (Figura 16). Los especímenes de Caluma (Bolívar), Echeandía (Bolívar), Sto. Domingo de Onzole (Esmeraldas), Cachaco (Imbabura), Pacto (Pichincha) y Paraíso Escondido (Pichincha), se agrupan cercanamente, mientras que los especímenes de Puerto Quito (Pichincha) se agrupan lejanamente. Esto se podría deber al pequeño número de especímenes analizados, por lo que para obtener resultados fiables, se recomienda analizar por lo menos quince especímenes de cada localidad (Linton, et al., 2002). De esta manera, tanto el análisis molecular como alométrico muestran que los especímenes de *C. insignis* del Ecuador forman una sola población, sin distinción de los sitios geográficos donde fueron capturados (Figura 14 y Figura 16).

8.5. Relaciones filogenéticas de *C. insignis* con especies del subgénero *Hoffmania*

La identificación molecular de especie es esencial para confirmar la morfología (Lassen, et al., 2012). El dominio D1-D2 del gen ribosomal 28S es un dominio conservado con distintas tasas de acumulación de mutaciones, útil para distinguir especies y subgéneros (Rentaría, 2007; Slama, et al., 2014).

El árbol filogenético ML obtenido a partir de D1-D2 muestra que todas las especies del subgénero *Hoffmania* (*C. batesi*, *C. diabolicus*, *C. fernandoi*, *C. filarifer*, *C. foxi*, *C. guttatus*, *C. ocumarensis*) y también *C. insignis*, se agrupan en un solo clado y se separan de la especie del subgénero *Avaritia* (*C. pusillus*), la cual se agrupa en otro clado (Figura 15).

El subgénero *Hoffmania* es monofilético y posee características morfológicas como área clara en la celda m1, área oscura en forma de reloj de arena en la celda r5 y un área clara cercana a la vena M2 (Wirth & Blanton, 1956b; Vargas, 1960). Estas dos últimas características, también comparte con el subgénero *Avaritia*, considerado el subgénero hermano de *Hoffmania*. No obstante, en este estudio se reconfirma que las especies men-

cionadas del subgénero *Hoffmania* comparten un ancestro en común, pero no se puede confirmar la relación con el subgénero *Avaritia* debido a la falta de otras especies.

Wirth, et al. (1988), debido a la variación morfológica observada, supusieron que *C. insignis* era un complejo de especies. Sin embargo, un sola agrupación de especímenes de *C. insignis* de Ecuador e Isla de Guadalupe, muestra la existencia de una especie definida. Por lo tanto, D1-D2 es un dominio útil en estos estudios ya que permite diferenciar entre especies de un mismo subgénero, pero no permite diferenciar poblaciones dentro de una misma especie (Slama, et al., 2014).

9. Conclusiones

Como mencionó Forattini (1957), “existe escasez de conocimiento de la biología de estos dípteros” aseveración que considero que aún prevalece, 57 años después.

1. COI y alometría sugieren que los especímenes de *Culicoides insignis* analizados poseen un baja variabilidad genética, por lo que los especímenes de la Región Costa y Sierra parecen estar relacionados.
2. D1-D2 sugiere que *C. insignis* no es un grupo de especies, sino una especie definida.
3. D1-D2 reconfirma que las especies *C. batesi*, *C. diabolicus*, *C. fernandoi*, *C. filarifer*, *C. insignis*, *C. foxi*, *C. guttatus* y *C. ocumarensis*, del subgénero *Hoffmania* son monofiléticas.
4. *C. fernandoi* se reporta por primera vez en el país, lo que constituye un nuevo registro para la fauna del Ecuador y *C. insignis* se reporta por primera vez en las provincias de Bolívar, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha.
5. A pesar del patrón de alas casi idéntico, *C. insignis* y *C. fernandoi* son especies morfológica y molecularmente distintas.

10. Recomendaciones

Se recomienda extender el estudio molecular y alométrico a otras provincias del Ecuador que se dedican a la crianza de ganado ovino y bovino, además de Cofán-Dureno, e incluir un mayor de especímenes por localidad.

Se recomienda realizar colectas entomológicas en localidades con altitudes mayores a 1500 msnm, donde se crían ovejas y estudios inmunológicos en animales de las localidades donde se encontró a *C. insignis*. Además, investigar las preferencias tróficas de *C. insignis* en el Ecuador.

11. Bibliografía

- Aguirre, E. (2007). Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología molecular* (págs. 49-61). México D.F.: Instituto Nacional de Ecología.
- Alarcón, P., & Lucientes, J. (2012). Actualización del catálogo de Culicoides Latreille, 1809 (Diptera, Ceratopogonidae) de España. *Graellsia*, 353-362.
- Ander, M., Troell, K., & Chirico, J. (2013). Barcoding of biting midges in the genus Culicoides: a tool for species determination. *Medical and veterinary entomology*, 323-331.
- Augot, D., & Depaquit, J. (2010). Problématique et enjeux de l'identification des espèces vectrices de la FCO en France. *Bulletin épidémiologique*, 5-7.
- Augot, D., Ninio, C., Akhoundi, M., Lehrter, V., Couloux, A., Jouet, D., & Depaquit, J. (2013). Characterization of two cryptic species, Culicoides stigma and Culicoides parroti (Diptera: Ceratopogonidae), based on barcode regions and morphology. *Vector ecology*, 260-265.
- Augot, D., Sauvage, F., Jouet, D., Simphal, E., Veuille, M., Couloux, A., Kaltenbach, M., & Depaquit, J. (2010). Discrimination of Culicoides obsoletus and Culicoides scoticus, potential bluetongue vectors, by morphometrical and mitochondrial cytochrome oxidase subunit I analysis. *Infection, genetics and evolution*, 629-637.
- Ayllón, T., Nijhof, A. M., Weiher, W., Bauer, B., Allène, X., & Clausen, P.-H. (2014). Feeding behaviour of Culicoides spp. (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle and sheep in northeast Germany. *Parasites & vectors*, 7-34.
- Beckenbach, A., & Borkent, A. (2003). Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit II. *Molecular phylogenetics and evolution*, 21-35.
- Bellis, G. (2014). *Key to females of economically important species of Culicoides subgenus Avaritia from India using characters visible under a stereomicroscope*. Winnellie: Northern Australia quarantine strategy.
- Biteau-Coroller, F., Guis, H., Mathieu, B., Carpenter, S., Baldet, T., & Roger, F. (2006). Vectorial capacity of Culicoides imicola in a new colonised area in Southern Mainland France. *Proceedings of the 11th International Symposium on veterinary epidemiology and economics*, 1-3.
- Borkent, A. (2012a). *The subgeneric classification of species of Culicoides - thoughts and a warning*. Recuperado el 27 de Junio de 2014, de Illinois Natural History Survey: <http://www.inhs.illinois.edu/files/7413/4219/9567/CulicoidesSubgenera.pdf>

- Borkent, A. (2012b). *World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae)*. Recuperado el 21 de Mayo de 2014, de Illinois Natural History Survey: <http://www.inhs.illinois.edu/files/8413/4219/9566/CeratopogonidaeCatalog.pdf>
- Borkent, A., & Spinelli, G. (2007). *Neotropical Ceratopogonidae (Diptera: Insecta)*. Sofia, Bulgaria: Pensoft.
- Braverman, Y., & Chechik, F. (1996). Air streams and the introduction of animal diseases borne on Culicoides (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Scientific and technical review*, 1037-1052.
- Brickle, D., & Hagan, D. (1999). The Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) of Belize, Central America. *Insecta mundi*, 39-44.
- Burneo, S. (2009). Megadiversidad. *Letras verdes*, 1-3.
- Calvo, J., Calvete, C., Martínez-Royo, A., Estrada, R., Miranda, M., Borrás, D., Sarto i Monteyés, V., & Pagès, N. (2009). Variations in the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene indicate northward expanding populations of Culicoides imicola in Spain. *Bulletin of entomological research*, 583-591.
- Carpenter, S., Lunt, H., Arav, D., Venter, G., & Mellor, P. (2006). Oral susceptibility to bluetongue virus of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *Medical entomology*, 73-78.
- Carr, S. (2013). *Transition versus transversion mutations*. Recuperado el 6 de Septiembre de 2014, de Memorial University: https://www.mun.ca/biology/scarr/Transitions_vs_Transversions.html
- Cêtre-Sossah, C., Baldet, T., Delécolle, J. C., Mathieu, B., Perrin, A., Grillet, C., & Albina, E. (2004). Molecular detection of Culicoides spp. and Culicoides imicola, the principal vector of bluetongue (BT) and African horse sickness (AHS) in Africa and Europe. *Veterinary research*, 325-337.
- Connelly, R. (2005). *Biting midges*. Recuperado el 24 de Junio de 2014, de University of Florida: http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures/aquatic/biting_midges.htm
- Darpe, K., Langner, K., Nimitz, M., Anthony, S., Brownlie, J., Takamatsu, H.-H., Mellor, P., & Merte, P. (2011). Saliva proteins of vector Culicoides modify structure and infectivity of bluetongue virus particles. *Plos one*, 1-12.
- de Meeûs, T., McCoy, K., Prugnolle, F., Chevillon, C., Durand, P., Hurtrez-Boussès, S., & Renaud, F. (2007). Population genetics and molecular epidemiology or how to "débusquer la bête". *Infection, genetics and evolution*, 308-332.
- Delécolle, J. C. (1985). *Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France*. Strasbourg: Université Louis Pasteur de Strasbourg.

- Dices. (2014). *Ecuador*. Recuperado el 2 de Septiembre de 2014, de Dices: <http://mapasamerica.dices.net/ecuador/>
- Distance to. (2014). *Distance to Ecuador-Guadalupe*. Recuperado el 24 de Septiembre de 2014, de Distance to: <http://es.distance.to/Ecuador/Guadalupe>
- Donnelly, M., Simard, F., & Lehmann, T. (2002). Evolutionary studies of malaria vectors. *Trends in parasitology*, 75-80.
- Dujardin, J.-P., & Slice, D. (2007). Contributions of morphometrics to medical entomology. En M. Tibayrenc, *Encyclopedia of infectious diseases: modern methodologies* (págs. 433-445).
- Dujardin, J.-P., Kaba, D., & Henry, A. (2010). The exchangeability of shape. *BMC research notes*, 1-7.
- ENSCONET. (2014). *Dispersión de semillas*. Recuperado el 11 de Noviembre de 2014, de European native seed conservation network (ENSCONET): <http://ensconet.maich.gr/es/Dispersion.htm>
- Escandon, M. (2011). *Lengua azul en bovinos*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Felippe-Bauer, M. L., Cáceres, A., Santos da Silva, C., Valderrama-Bazan, W., Gonzales-Perez, A., & Martins, J. (2008). New records of Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Peruvian Amazonian region. *Biota Neotropica*, 33-38.
- Florêncio, F., Okada, Y., & Felippe-Bauer, M. L. (2010). Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) de la villa de Alter do Chão, Santarém, Estado de Pará, Brasil. *Pan-Amazônica de Saúde*, 69-74.
- Flores, R. (2007). La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. En L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología molecular* (págs. 325-349). México D.F.: Instituto Nacional de Ecología.
- Forattini, O. (1957). *Culicoides da Região Neotropical (Diptera. Ceratopogonidae)*. São Paulo, Brasil: Universidad de São Paulo.
- Fox, I. (1948). Hoffmania, a new subgenus in Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 21-28.
- Friedrich, M., & Tautz, D. (1997). Evolution and phylogeny of the Diptera: a molecular phylogenetic analysis using 28S rDNA sequences. *Systematic biology*, 674-698.
- Gan, M., & Rao, V. (1994). The influence of the Andes Cordillera on transient disturbances. *American Meteorological Society*, 1141-1157.
- Garros, C., Balenghien, T., Carpenter, S., Delécolle, J.-C., Meiswinkel, R., Pédarrieu, A., Rakotoarivony, I., Gardès, L., Golding, N., Barber, J., Miranda, M., Borràs, D.,

- Goffredo, M., & Monaco, F. (2014). Towards the PCR-based identification of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): results from an international ring trial targeting four species of the subgenus *Avaritia*. *Parasites & vectors*, 1-9.
- Garros, C., Mathieu, B., Balenghien, T., & Delécolle, J.-C. (2009). Systematics and taxonomy of the genus *Culicoides* what is coming next? *MedReoNet taxonomy meeting*, 1-24.
- Glick, J. (1990). *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) of Kenya. *Medical entomology*, 85-195.
- Goffredo, M., & Meiswinkel, R. (2004). Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria Italiana*, 260-265.
- Gomulski, L., Meiswinkel, R., Delécolle, J. C., Goffredo, M., & Gasperi, G. (2006). Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and veterinary entomology*, 229-238.
- González, M., Baldet, T., Delécolle, J. C., López, S., Romón, P., & Goldarazena, A. (2013). Monitoring of *Culicoides latreille* (Diptera: Ceratopogonidae) after BTV outbreaks, in sheep farms and natural habitats from the Basque Country (Northern Spain). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 48-69.
- Gorman, B. (1989). The bluetongue viruses. En P. Roy, & B. Gorman, *Current topics in microbiology and immunology* (págs. 1-19). Birmingham: Springer-Verlag.
- Gualapuro, M. (2013). *Contribución al estudio de la fauna de Culicoides (Díptera: Ceratopogonidae) en la zona norte del Ecuador*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Hadj Henni, L., Sauvage, F., Ninio, C., Depaquit, J., & Augot, D. (2014). Wing geometry as a tool for discrimination of *Obsoletus* group (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) in France. *Infection, genetics and evolution*, 110-117.
- Haro, A., Pagès, N., & Sarto i Monteys, V. (2005). Relaciones filogenéticas, según el gen citocromo oxidasa I (COI), entre la fauna Ibero-Marroquí de *Cataglyphis* grupo *albicans* (Hym. Formicidae). *Boletín de la Asociación Española de Entomología*, 99-109.
- Hebert, P., deWaard, J., & Landry, J.-F. (2009). DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology letters*, 1-4.
- Holbrook, F., Tabachnick, W., & Brady, R. (1996). Genetic variation in populations of *Culicoides variipennis* complex in the six New England states, U.S.A. *Medical and veterinary entomology*, 173-180.

- Hoy, M. (2013). *Insect molecular genetics*. San Diego: Academic Press.
- Huerta, H. (2007). Datos del material tipo de Culicoides (*Drymodesmyia*) *bakeri* Vargas (Diptera: Ceratopogonidae). *Acta zoológica mexicana*, 23-28.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2013). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC-2013*. Recuperado el 13 de Octubre de 2014, de Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC): <http://www.ecuadoren cifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- Kato, H., Cáceres, A., Gomez, E., Mimorie, T., Uezato, H., & Hashiguchi, Y. (2014). Genetic divergence in populations of *Lutzomyia ayacuchensis*, a vector of Andean-type cutaneous leishmaniasis, in Ecuador and Peru. *Acta tropica*, 79-87.
- Kazak, L., Reyes, A., & Holt, I. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nature reviews*, 659–671.
- Kramer, W., Greiner, E., & Gibbs, P. (1985). Seasonal variations in population size, fecundity and parity rates of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) in Florida, USA. *Medical entomology*, 163-169.
- Lager, I. (2004). Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana*, 89-93.
- Lassen, S., Nielsen, S. A., Skovgård, H., & Kristensen, M. (2012). Molecular differentiation of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) from the subgenus *Culicoides* Latreille in Denmark. *Parasitology research*, 1765-1771.
- Lehmann, K., Werner, D., Hoffmann, B., & Kampen, H. (2012). PCR identification of culicoid biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) of the *Obsoletus* complex including putative vectors of bluetongue and Schmollenberg viruses. *Parasites & vectors*, 1-9.
- Levi-Castillo, R. (1958). Provisional list of the Culicidae, Simuliidae, Phlebotomus and Culicoides of Ecuador. *Medical and veterinary entomology*, 867-870.
- Linley, J. (1965). Descriptions of the pupae of *Culicoides barbosai*, *C. insignis*, and *C. borinqueni* (Diptera: Ceratopogonidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 57-63.
- Linton, Y.-M., Mordue, J., Cruickshank, R., Meiswinkel, R., Mellor, P., & Dallas, J. (2002). Phylogenetic analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene of five species of the *Culicoides imicola* species complex. *Medical and veterinary entomology*, 139-146.
- Lopes, R., & De Sousa, I. (2010). Jejenes (Diptera: Ceratopogonidae: Culicoides), luego de la estación de lluvias, en la Reserva de Desarrollo Sostenible Itatupã-Baquiá, Gurupá, Pará, Brasil. *Pan-Amazônica de Saúde*, 121-130.

- López, W., Nicoletti, P., & Gibbs, P. (1985). Antibody to bluetongue virus in cattle in Ecuador. *Tropical animal health and production*, 82-82.
- Lunt, D., Zhang, D.-X., Szymura, J., & Hewitt, G. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect molecular biology*, 153-165.
- MacLachlan, J. (1994). The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comparative immunology, microbiology & infectious diseases*, 197-206.
- MacLachlan, J., Drew, C., Darpel, K., & Worwa, G. (2009). The pathology and pathogenesis of bluetongue. *Comparative pathology*, 1-16.
- Martínez de la Puente, J., Martínez, J., Ferraguti, M., Morales de la Nuez, A., Castro, N., & Figuerola, J. (2012). Genetic characterization and molecular identification of the bloodmeal sources of the potential bluetongue vector *Culicoides obsoletus* in the Canary Islands, Spain. *Parasites & vectors*, 1-7.
- Matsumoto, Y., Yanase, T., Tsuda, T., & Noda, H. (2009). Characterization of internal transcribed spacer (ITS1-2) region of ribosomal RNA gene from 25 species of *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Japan. *Medical entomology*, 1099-1108.
- Mayo, C., Mullens, B., Reisen, W., Osborne, C., Gibbs, P., Gardner, I., & MacLachlan, J. (2014). Seasonal and interseasonal dynamics of bluetongue virus infection of dairy cattle and *Culicoides sonorensis* midges in Northern California - Implications for virus overwintering in temperate zones. *Plos one*, 1-6.
- McAlpine, F., Peterson, V., Shewell, E., Teskey, J., Vockeroth, R., & Wood, M. (1981). *Manual of Nearctic Diptera* (Vols. I, II, III). Gatineau, Canada: Canadian Government Publishing Centre.
- Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leijts, P., & Goffredo, M. (2007). Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Veterinary record*, 564-565.
- Mellor, P., Boorman, J., & Baylis, M. (2000). *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual review of entomology*, 307-340.
- Merino, C. (2011). *Identificación de anticuerpos precipitantes para el virus de la lengua azul en suero de ovinos de la parte alta y baja de la provincia de Pichincha*. Quito: Universidad de las Américas.
- Morag, N., Saroya, Y., Braverman, Y., Klement, E., & Gottlieb, Y. (2012). Molecular identification, phylogenetic status, and geographic distribution of *Culicoides oxystoma* (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel. *Plos one*, 1-7.
- Mullens, B., Gerry, A., Lysyk, T., & Schmidtman, E. (2004). Environmental effects on vector competence and virogenesis of bluetongue virus in *Culicoides*: interpreting laboratory data in a field context. *Epidemiology and vectors*, 160-166.

- Muñoz, F., Talavera, S., & Pagès, N. (2011). Geometric morphometrics of the wing in the subgenus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae): from practical implications to evolutionary interpretations. *Medical entomology*, 129-139.
- Ninio, C. (2011). *Fièvre catarrhale ovine dans les Ardennes: étude de la biologie des Culicoides et de leur rôle épidémiologique*. Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Nolan, D., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P., Dallas, J., Mordue (Luntz), J., & Piertney, S. (2007). Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary microbiology*, 1-13.
- Ogedengbe, J., Hanner, R., & Barta, J. (2011). DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International journal for parasitology*, 843-850.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2014). *Bluetongue virus (BTV) and African horse sickness virus (AHSV)*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2014, de Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE): <http://www.oie.int/>
- Pagès, N., & Sarto i Monteys, V. (2005). Differentiation of *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus* (Diptera: Ceratopogonidae) based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I. *Medical entomology*, 1026-1034.
- Pagès, N., Muñoz, F., Talavera, S., Sarto i Monteys, V., Lorca, C., & Núñez, J. I. (2009). Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary parasitology*, 298-310.
- Perrin, A., Cêtre-Sossah, C., Mathieu, B., Baldet, T., Delécolle, J. C., & Albina, E. (2006). Phylogenetic analysis of *Culicoides* species from France based on nuclear ITS1-rDNA sequences. *Medical and veterinary entomology*, 219-228.
- Perruolo, G. (2009). Clave de las especies de *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) asociadas con la ganadería en la región neotropical. *Científica*, 124-133.
- Pili, E., Carcangiu, L., Oppo, M., & Marchi, A. (2010). Genetic structure and population dynamics of the biting midges *Culicoides obsoletus* and *Culicoides scoticus*: implications for the transmission and maintenance of bluetongue. *Medical and veterinary entomology*, 441-448.
- Qiagen. (2005). *AllPrep DNA/RNA mini handbook*. Duesseldorf, Alemania: Qiagen.
- Quiñonez, A. M. (2011). *Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa C, subunidad I (COI) y evaluación de su contenido informativo en dos poblaciones de Urotrygon aspidura del Pacífico Vallecaucano*. Santiago de Cali: Universidad del Valle.

- Rawlings, P. (1996). A key, based on wing patterns of biting midges (Genus *Culicoides* Latreille-Diptera: Ceratopogonidae) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies. *Graellsia*, 57-71.
- Rebolledo, R., Huala, L., Carrillo, R., Espinoza, A., & Paredes, M. (2013). *Caracterización y análisis de variabilidad genética en poblaciones de Calvertius tuberosus (Fairmaire & Germain) (Coleoptera: Curculionidae)*. Temuco: Universidad de La Frontera.
- Rentaría, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, *Ecología molecular* (págs. 541-566). México D.F.: Instituto Nacional de Ecología.
- Ronderos, M., Greco, N., & Spinelli, G. (2003). Diversity of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) in the area of the Yacyretá Dam lake between Argentina and Paraguay. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 19-24.
- Rull, V. (2011). Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in ecology & evolution*, 508–514.
- Slama, D., Chaker, E., Mathieu, B., Babba, H., Depaquit, J., & Augot, D. (2014). Biting midges monitoring (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in the governate of Monastir (Tunisia): species composition and molecular investigations. *Parasitology research*, 2435–2443.
- Spinelli, G., Santamaría, E., Cabrera, O., Ronderos, M., & Suárez, M. (2009). Five new species of *Culicoides* Latreille described from Colombia, yielding a new species list and country records (Diptera: Ceratopogonidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 81-92.
- Swanson, D. (2012). *Ecology and phylogeny of the biting midge genus Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae)*. Clemsom: University Clemsom.
- Tabachnick, W. (1996). *Culicoides variipennis* and bluetongue virus epidemiology in the United States. *Annual review of entomology*, 23-43.
- Tanya, V., Greiner, E., & Gibbs, P. (1992). Evaluation of *Culicoides insignis* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus. *Veterinary microbiology*, 1-14.
- Torres, A. (2014). *Identificación molecular de las preferencias tróficas del género Culcioides en cinco provincias del Ecuador*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Universidad Complutense de Madrid. (2004). *Dípteros: Culicoides, Ceratopogónidos*. Recuperado el 22 de Abril de 2014, de Universidad Complutense de Madrid: <http://escalera.bio.ucm.es/usuarios/ea/sesiones.php?sesion=105&bloque=3>

- Universidad de Granada. (2013). *Fenética*. Recuperado el 18 de Junio de 2014, de Universidad de Granada: <http://www.ugr.es/~mcasares/Conceptos/Sistemica/Fenetica.htm>
- Universidad de Puerto Rico. (2010). *Los majes "biting midges" (Ceratopogonidae)*. Mayagüez: Universidad de Puerto Rico.
- Vargas, L. (1960). The subgenera of Culicoides of the Americas (Diptera, Ceratopogonidae). *Biología tropical*, 35-47.
- Veggiani, C., Dantur, M., Lizarralde, M., & Spinelli, G. (2011). Spatial and temporal distribution of Culicoides insignis and Culicoides paraensis in the subtropical mountain forest of Tucumán, northwestern Argentina. *Florida entomologist*, 1018-1025.
- Vela, G. (2014). *Variación genética de Nyssomyia trapidoi (Diptera: Psychodidae) en tres zonas endémicas de leishmaniasis cutánea en el Ecuador*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Wirth, W., & Arnaud, P. (1969). Polynesian biting midges of the genus Culicoides (Diptera : Ceratopogonidae). *Pacific insects*, 507-520.
- Wirth, W., & Blanton, F. (1956a). A new species of salt-marsh sand fly from Florida, The Bahamas, Panama and Ecuador. *Florida entomologist*, 157-162.
- Wirth, W., & Blanton, F. (1956b). Studies in Panama Culicoides. VIII. The Neotropical species of the Guttatus group of the subgenus Hoffmania (Diptera: Heleidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 305-326.
- Wirth, W., & Blanton, F. (1959). Biting midges of the genus Culicoides from Panama (Diptera: Heleidae). *Proceedings of the United States National Museum*, 237-482.
- Wirth, W., & Blanton, F. (1974). *The West Indian sandflies of the genus Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae)*. Washington D.C., Estados Unidos: U.S. Government Printing Office.
- Wirth, W., & Felipe-Bauer, M. L. (1989). The neotropical biting midges related to Culicoides paraensis (Diptera: Ceratopogonidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 551-565.
- Wirth, W., Dyce, A., & Spinelli, G. (1988). *An atlas of wing photographs, with a summary of the numerical characters or the neotropical species of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae)*. Gainesville, Estados Unidos: American Entomological Institute.
- Wittmann, E., Mellor, P., & Baylis, M. (2001). Using climate data to map the potential distribution of Culicoides imicola (Diptera: Ceratopogonidae) in Europe. *Scientific and technical review of the Office International des Epizooties*, 731-740.

- Zapata, S., Mejía, L., Le Pont, F., León, R., Pesson, B., Ravel, C., Bichaud, L., Charrel, R., Cruaud, C., Trueba, G., & Depaquit, J. (2012). A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasites & vectors*, 5-14.
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect molecular biology*, 143-150.

12. Figuras

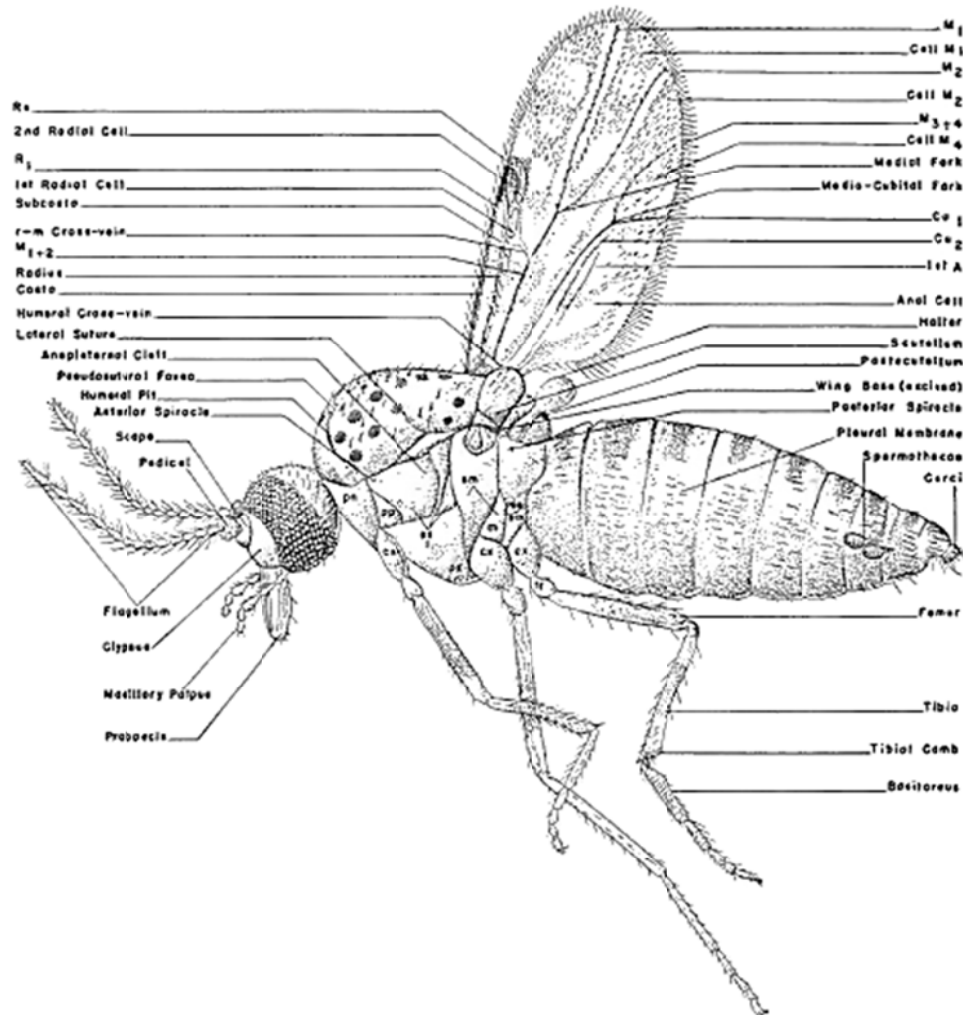


Figura 1. Morfología del cuerpo de una hembra del género *Culicoides*, tomado de Wirth & Blanton, 1959.

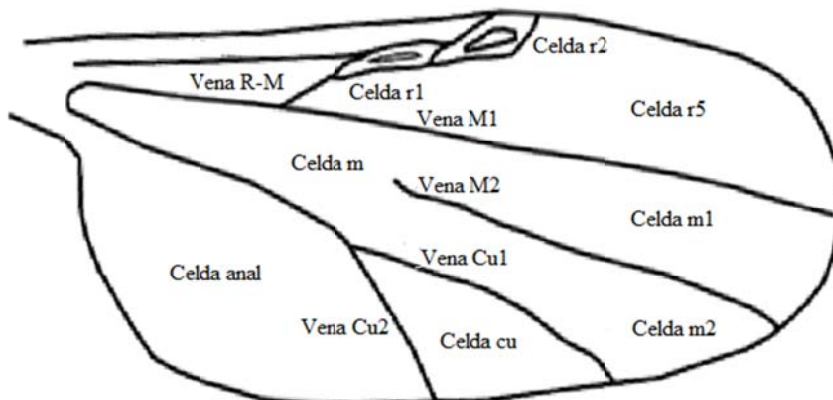


Figura 2. Morfología del ala de una hembra del género *Culicoides*, adaptado de Rawlings, 1996.

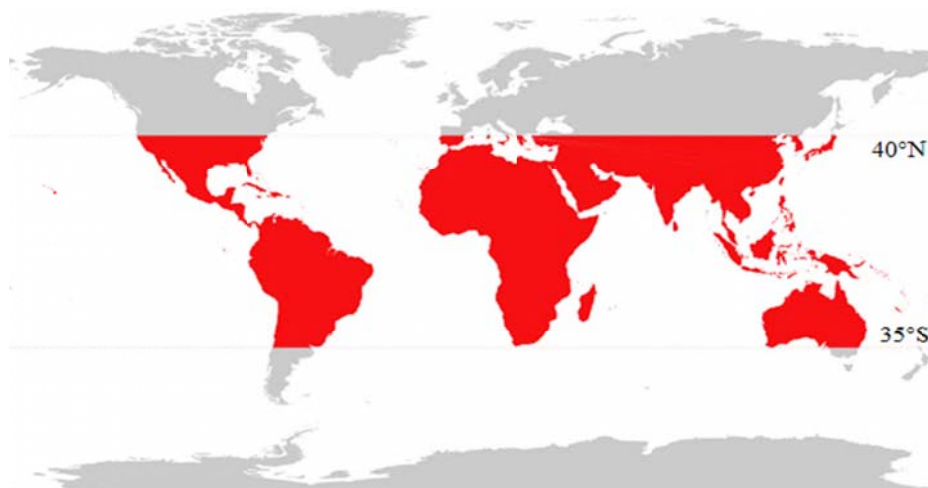


Figura 3. Distribución mundial de VLA, adaptado de Ninio, 2011.



Figura 4. Distribución mundial de *C. insignis*, adaptado de Dices, 2014

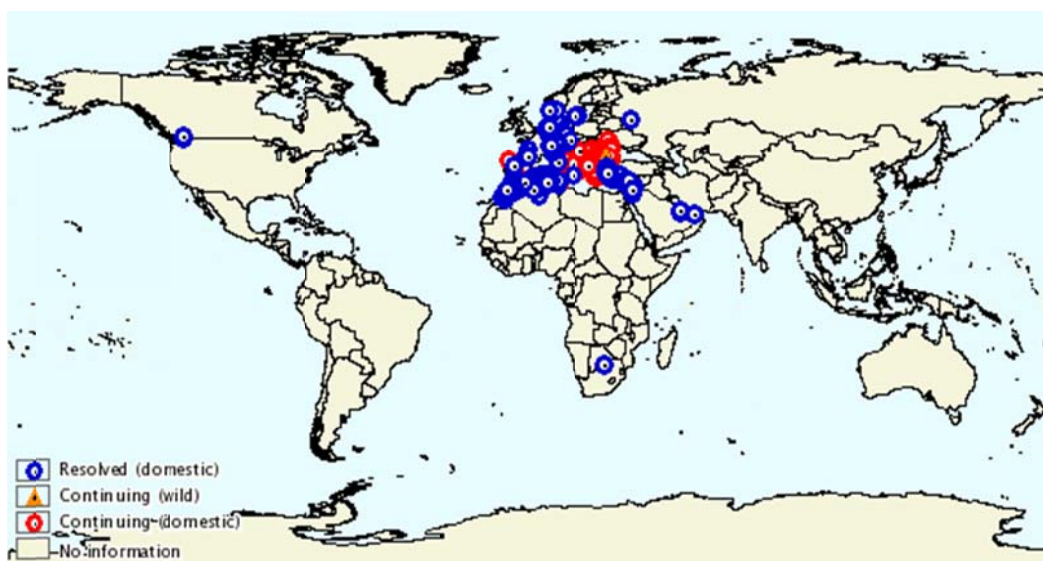


Figura 5. Brotes de FCO reportados en los años 2009-2014, tomado de OIE, 2014.

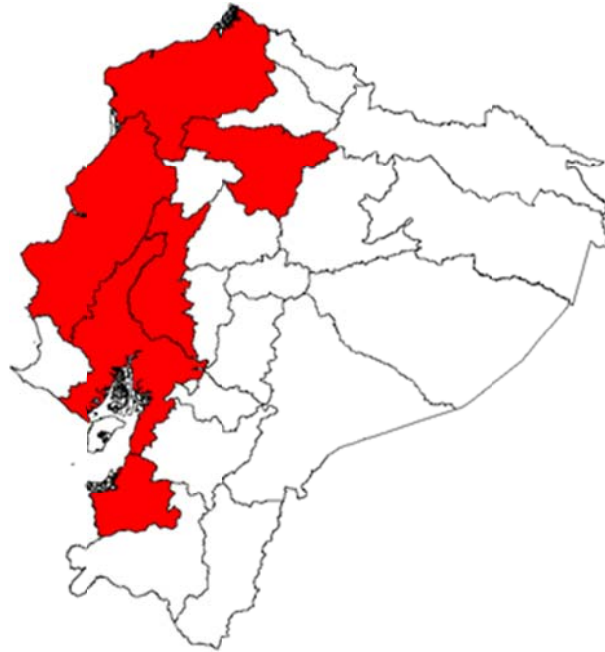


Figura 6. Mapa del Ecuador con las seis provincias donde se ha reportado la presencia de anticuerpos para VLA en ganado ovino, bovino y caprino, fuente López, et al., 1985, Mantilla, 1998; y Merino, 2011, adaptado de Dices, 2014.

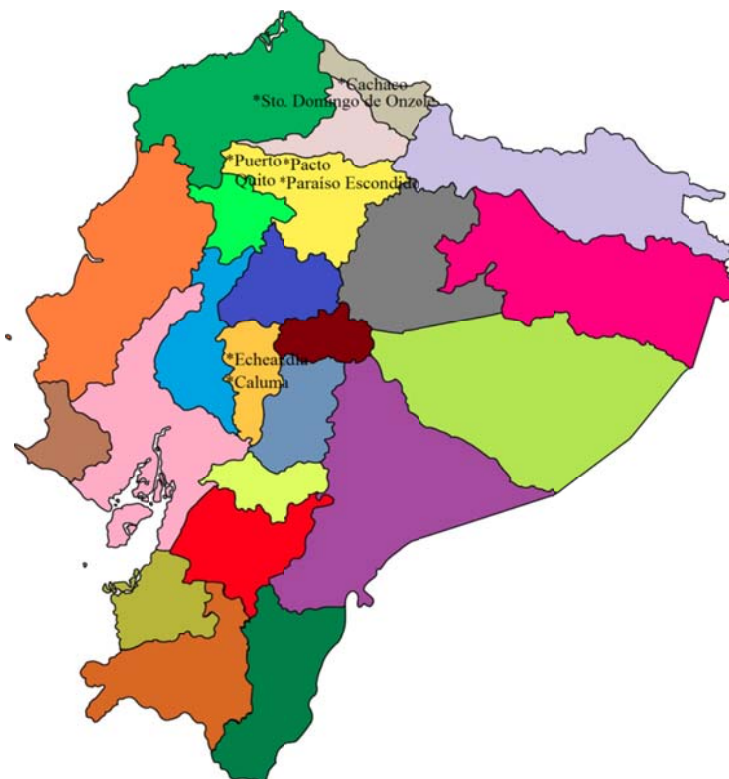


Figura 7. Mapa del Ecuador con las siete localidades donde se capturó *C. insignis*, adaptado de Dices, 2014.

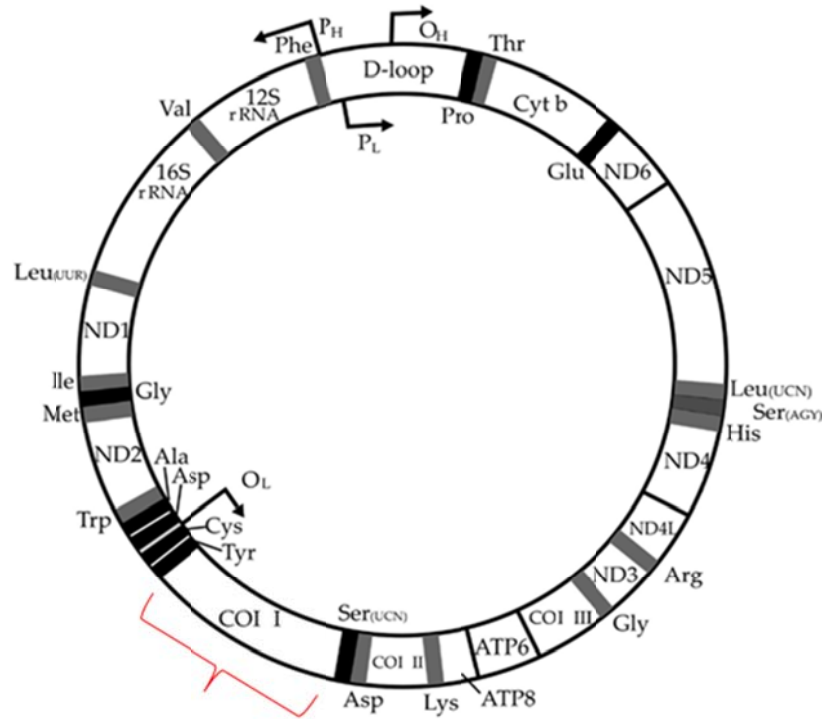


Figura 8. ADN mitocondrial (ADNmt) con el gen citocromo oxidasa I (COI), adaptado de Zapata, 2014.

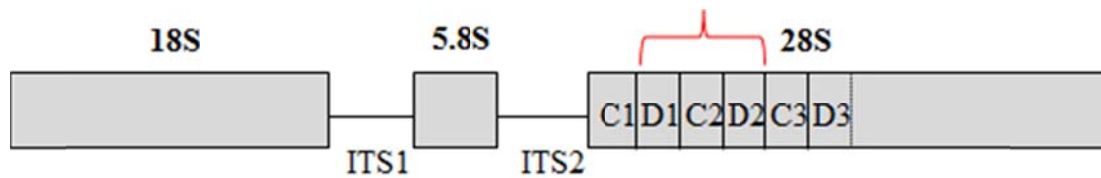


Figura 9. ADN ribosomal (ADNr) con el dominio D1-D2 de la subunidad 28S, adaptado de Zapata, 2014.

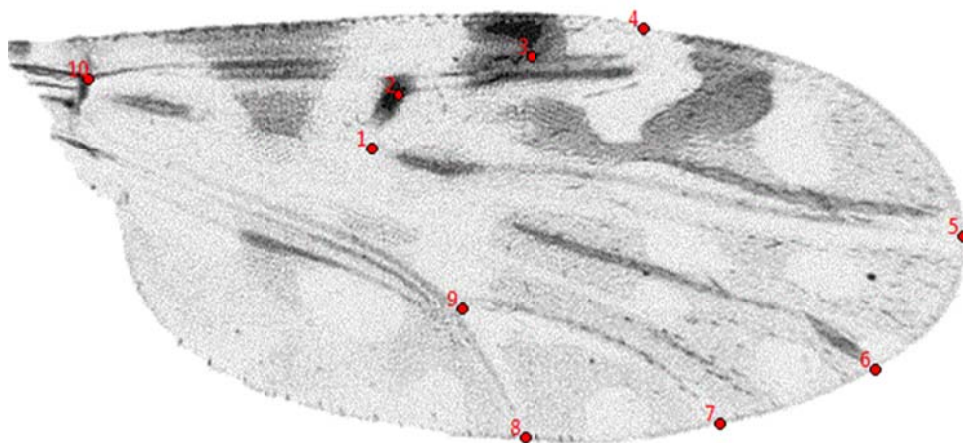


Figura 10. Ala de una hembra de *C. insignis* con la localización anatómica de los 10 landmarks utilizados en el análisis alométrico.

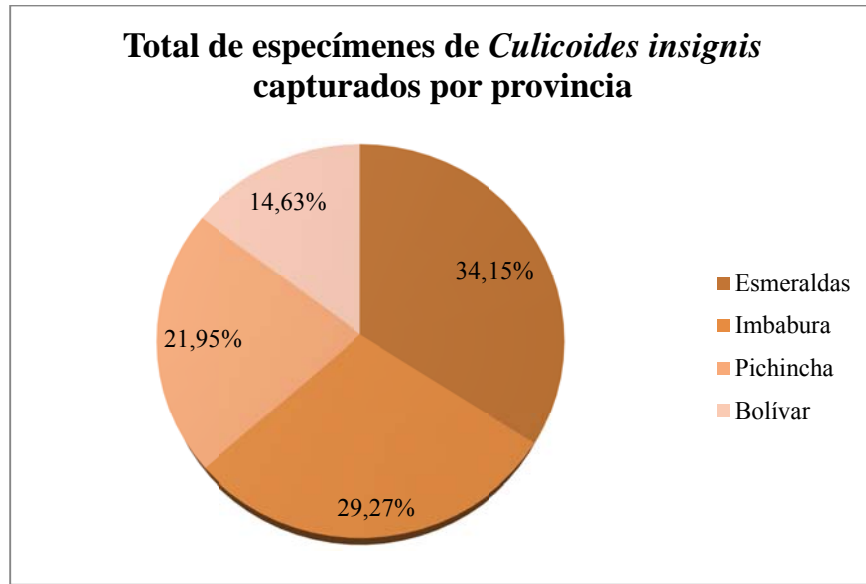


Figura 11. Total de especímenes de *C. insignis* capturados por provincia.

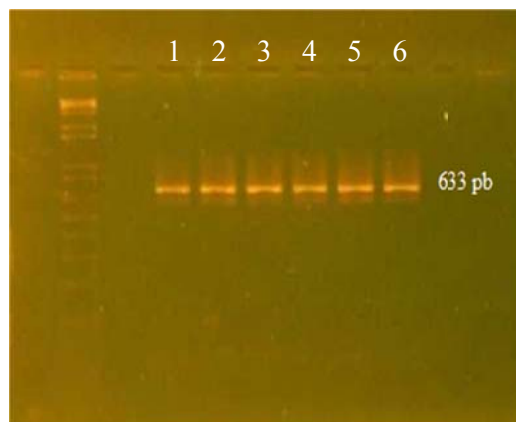


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y bromuro de etidio al 0,15% de la amplificación de COI de especímenes de *C. insignis* del Ecuador.

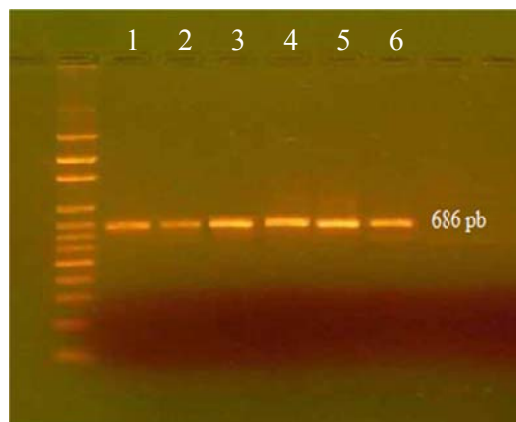


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y bromuro de etidio al 0,15% de la amplificación de D1-D2 de especímenes de *C. insignis* del Ecuador.

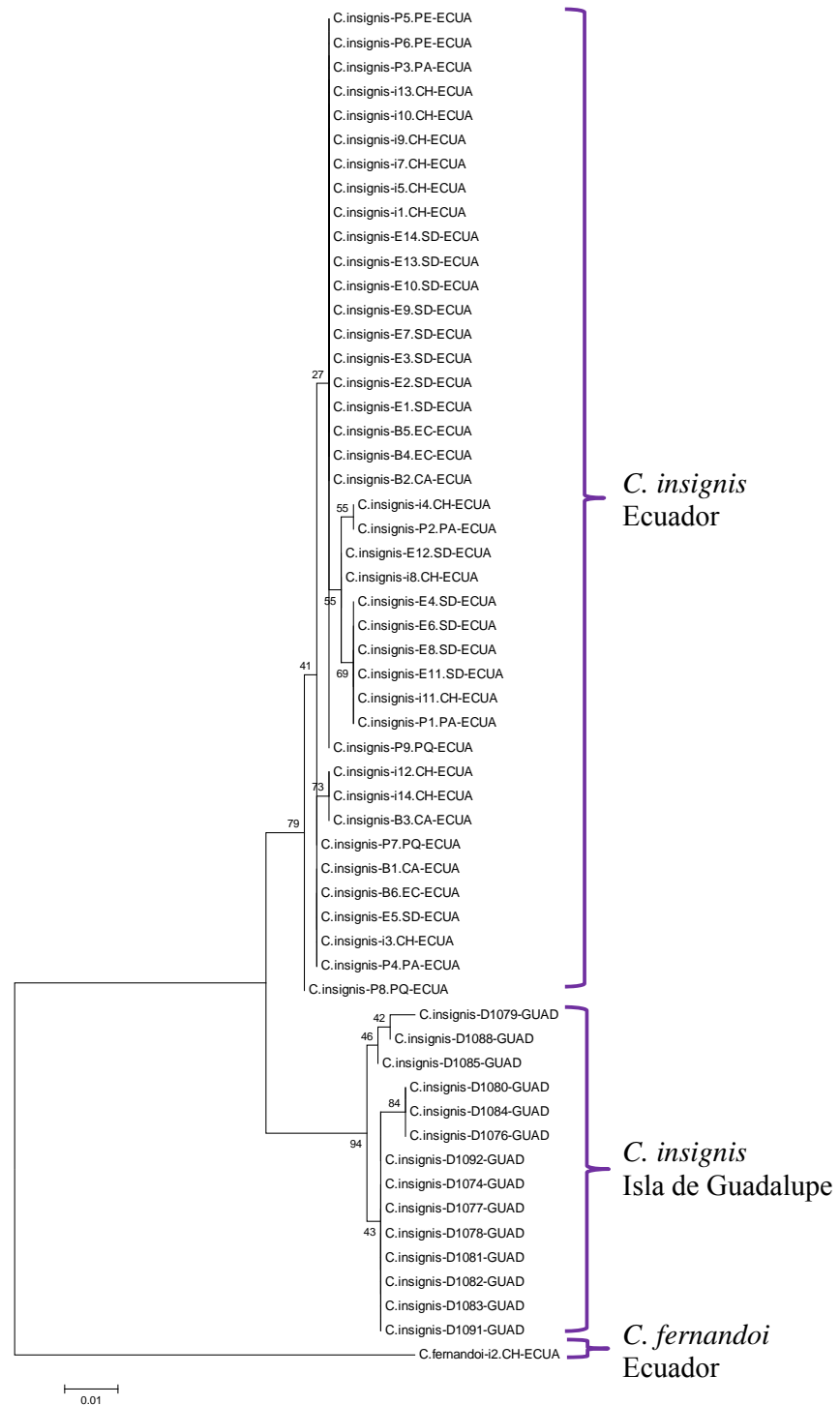


Figura 14. Árbol filogenético de COI obtenido por el método de Maximum-Likelihood (ML) de especímenes de *C. insignis* de Ecuador (ECUA) e Isla de Guadalupe (GUAD); y *C. fernandoi* de Ecuador (ECUA). Especímenes de Bolívar (B) Caluma (CA) y Echeandía (EC); de Esmeraldas (E) Sto. Domingo de Onzole (SD); de Imbabura (i) Cachaco (CH); y de Pichincha (P) Pacto (PA), Paraíso Escondido (PE) y Puerto Quito (PQ).

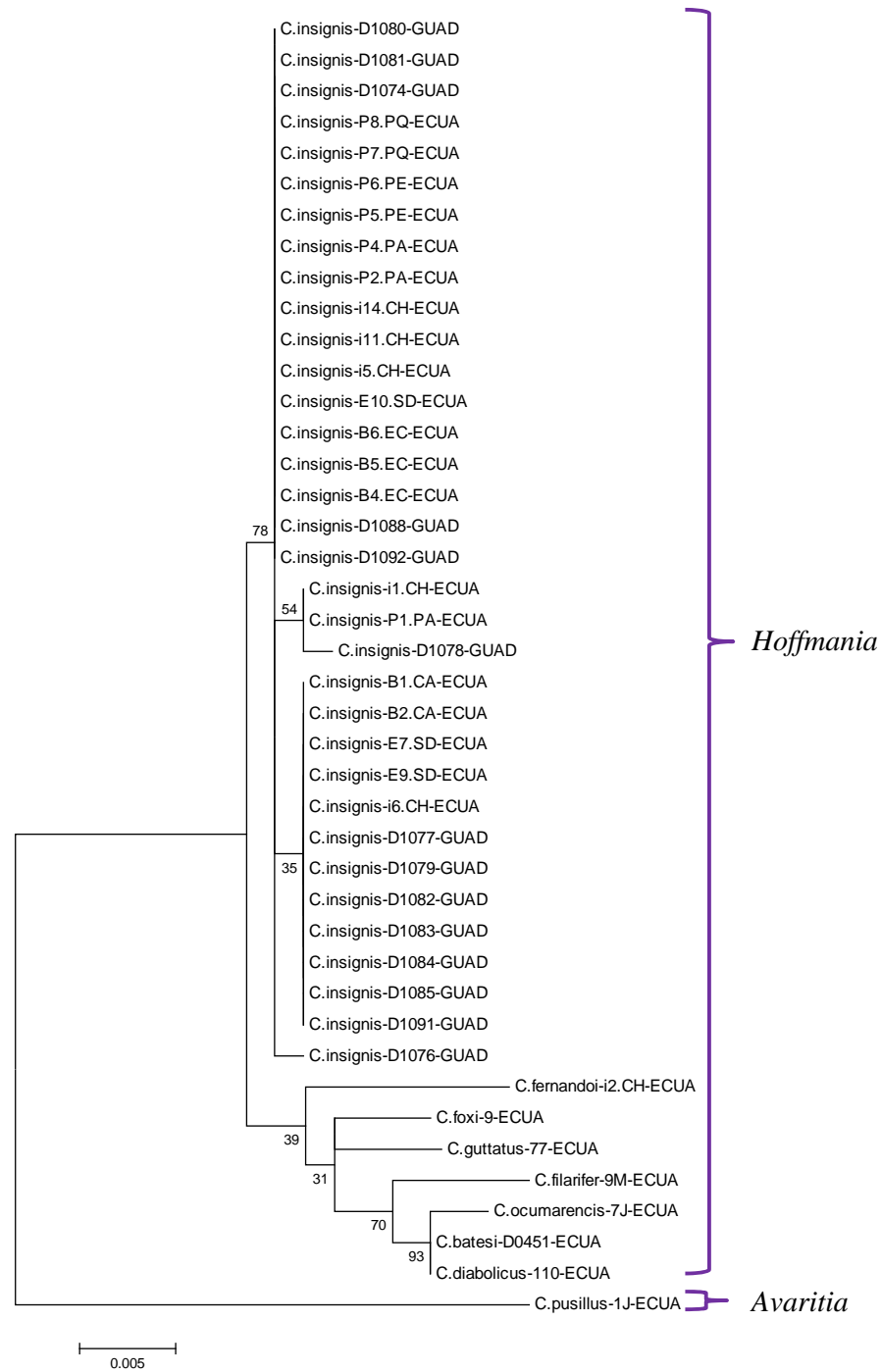


Figura 15. Árbol filogenético de D1-D2 obtenido por el método de Maximum-Likelihood (ML) de especímenes de *C. insignis* y otras especies del subgénero *Hoffmania* de Ecuador (ECUA) y *C. insignis* de la Isla de Guadalupe (GUAD). Especímenes de Bolívar (B) Caluma (CA) y Echeandía (EC); de Esmeraldas (E) Sto. Domingo de Onzole (SD); de Imbabura (i) Cachaco (CH); y de Pichincha (P) Pacto (PA), Paraíso Escondido (PE) y Puerto Quito (PQ).

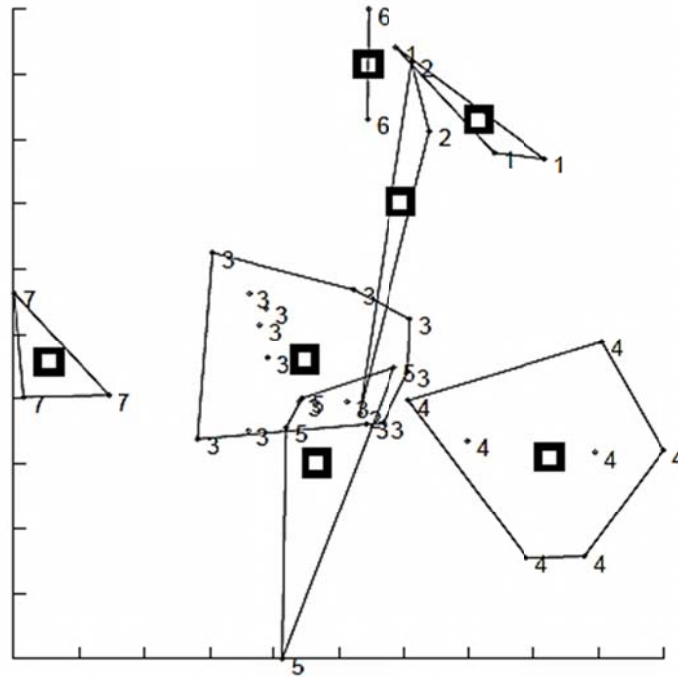


Figura 16. Análisis discriminativo (DA) de alas de 36 hembras de *C. insignis*. 1. Caluma (Bolívar); 2. Echeandía (Bolívar); 3. Sto. Domingo de Onzole (Esmeraldas); 4. Cachaco (Imbabura); 5. Pacto (Pichincha); 6. Paraíso Escondido (Pichincha) 7. Puerto Quito (Pichincha).

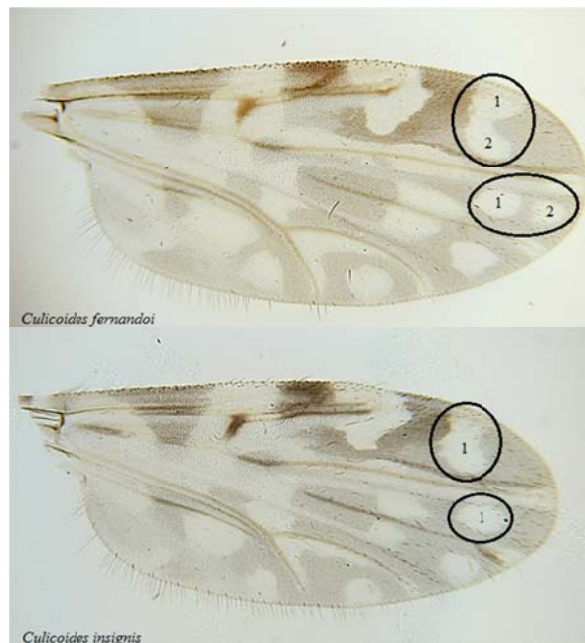


Figura 17. Comparación del patrón de alas de *C. fernandoi* (i2.CH) y *C. insignis* (E8.SD). Los círculos indican las diferencias morfológicas entre estas dos especies, dos áreas blancas en *C. fernandoi* y un área blanca en *C. insignis* tanto en la celda r5 como m1.

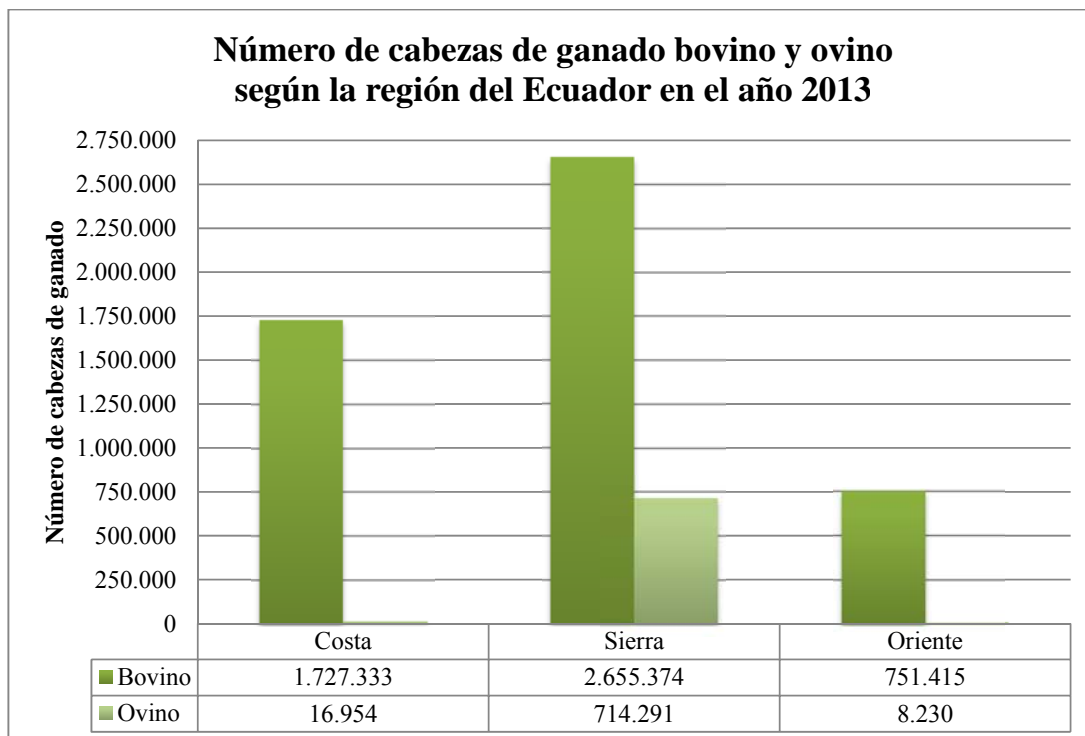


Figura 18. Distribución del ganado bovino y ovino en las tres regiones del Ecuador, fuente INEC, 2013.

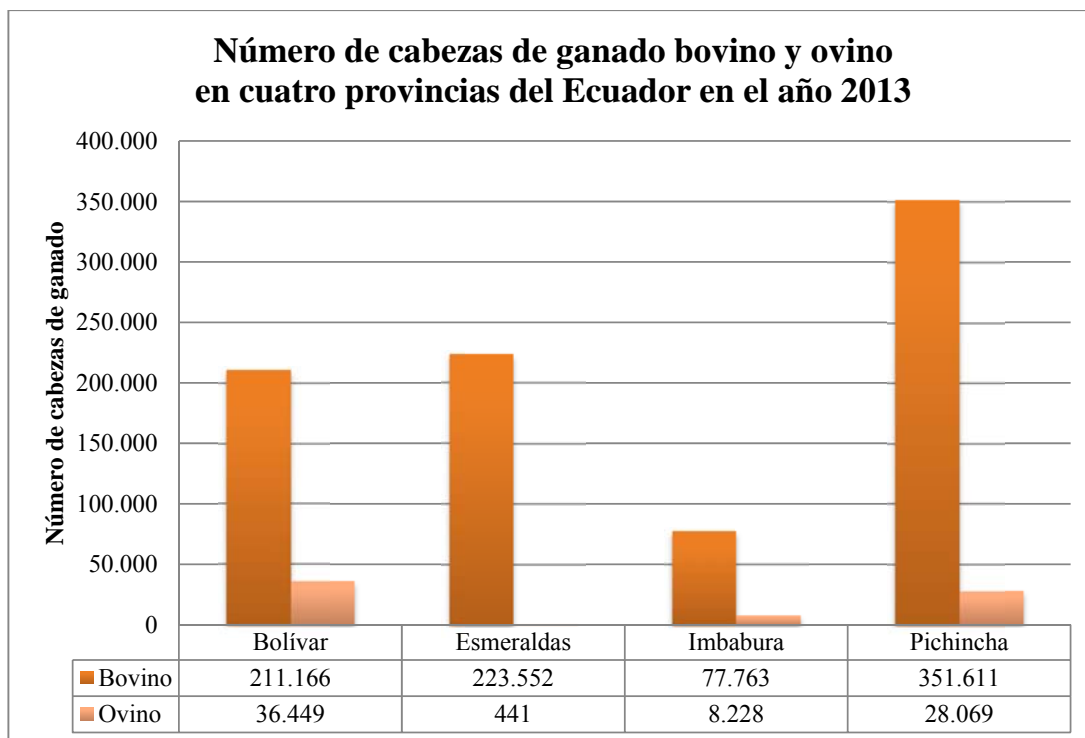




Figura 19. Número de cabezas de ganado bovino y ovino en cuatro provincias del Ecuador en el año 2013, fuente INEC, 2013.

13. Tablas

Tabla 1. Casos reportados de FCO en los países de América del Sur en los años 2010-2014, fuente OIE, 2014.

País	Período									
	2010		2011		2012		2013		2014	
	Ene- Jun	Jul- Dic	Ene- Jun	Jul- Dic	Ene- Jun	Jul- Dic	Ene- Jun	Jul- Dic	Ene- Jun	Jul- Dic
 Argentina										
 Bolivia										
 Brasil										
 Chile										
 Colombia										
 Ecuador										
 Guyana										
 Paraguay										
 Perú										
 Surinam										
 Trinidad y Tobago										
 Uruguay										
 Venezuela										

	Información no disponible
	Enfermedad no reportada en este periodo
	Enfermedad nunca reportada
	Enfermedad sospechada pero no confirmada
	Enfermedad confirmada pero sin enfermedad clínica
	Enfermedad presente pero limitada a una o más zonas
	Enfermedad presente
	Infección/infestación en una o más zonas
	Enfermedad sospechada pero no confirmada limitada a una o más zonas

Tabla 2. Descripción de los sitios de colección de especímenes de *C. insignis*.

Sitio			Datos			
Provincia	Cantón	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Ecosistema
Bolívar	Caluma	Caluma	S01°40'16''	W79°14'40''	418	Bosque secundario templado subtropical.
	Echeandía	Echeandía	S01°22'36''	W79°15'39''	711	Bosque secundario templado subtropical.
Esmeraldas	Eloy Alfaro	Sto. Domingo de Onzole	N00°48'04''	W79°04'31''	220	Bosque secundario húmedo tropical.
Imbabura	San Miguel de Urcuquí	Cachaco	N00°83'33''	W78°46'67''	908	Bosque secundario húmedo tropical.
Pichincha	Quito	Pacto	N00°08'37''	W78°48'04''	1458	Bosque secundario templado subtropical.
	Pedro Vicente Maldonado	Paraíso escondido	N00°85'03''	W79°17'49''	656	Bosque secundario húmedo tropical
	Puerto Quito	Puerto Quito	N00°85'53''	W79°17'71''	371	Bosque secundario húmedo tropical

Tabla 3. Lista de especímenes de *C. insignis* de acuerdo al sitio de colección y sexo.

Sitio		<i>Culicoides insignis</i>			
Provincia	Localidad	♂	♀	Subtotal	Porcentaje (%)
Bolívar	Caluma	0	3	3	14,63
	Echeandía	0	3	3	
Esmeraldas	Sto. Domingo de Onzole	0	14	14	34,15
Imbabura	Cachaco	5	7	12	29,27
Pichincha	Pacto	0	4	4	21,95
	Paraíso escondido	0	2	2	
	Puerto Quito	0	3	3	
Total		5	36	41	-
Porcentaje (%)		12,20	87,80	-	

Tabla 4. Variabilidad nucleotídica de las secuencias alineadas de COI (433pb) de especímenes de *C. insignis* de Ecuador (ECUA) e Isla de Guadalupe (GUAD); y *C. fernandoi* de Ecuador (ECUA). Se presenta 20 sitios informativos. Los números en la parte superior, leyéndose de forma vertical, representan la posición del nucleótido en la secuencia. Los puntos (.) representan igualdad en la base nitrogenada, mientras que los guiones (-) representan deleciones o inserciones. Además se presentan 7 haplotipos en los especímenes *C. insignis* del Ecuador.

Código espécimen	Secuencia	
	1111 234452457 9351708023	2222333444 1268027133 5461804623
<i>C. insignis</i> -B2.CA-ECUA	CGAGTTATCT	TAAAAACTGC
<i>C. insignis</i> -B4.EC-ECUA
<i>C. insignis</i> -B5.EC-ECUA
<i>C. insignis</i> -E1.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -E2.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -E3.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -E7.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -E9.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -E10.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -E13.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -E14.SD-ECUA
<i>C. insignis</i> -i1.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -i5.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -i7.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -i9.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -i10.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -i13.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -P3.PA-ECUA
<i>C. insignis</i> -P5.PE-ECUA
<i>C. insignis</i> -P6.PE-ECUA
<i>C. insignis</i> -P9.PQ-ECUA
<i>C. insignis</i> -B1.CA-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -B6.EC-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -E5.SD-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -i3.CH-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -P4.PA-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -P7.PQ-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -E4.SD-ECUAC....	...G....
<i>C. insignis</i> -E6.SD-ECUAC....	...G....
<i>C. insignis</i> -E8.SD-ECUAC....	...G....
<i>C. insignis</i> -E11.SD-ECUAC....	...G....
<i>C. insignis</i> -i11.CH-ECUAC....	...G....
<i>C. insignis</i> -P1.PA-ECUAC....	...G....
<i>C. insignis</i> -B3.CA-ECUAT...
<i>C. insignis</i> -i12.CH-ECUAT...
<i>C. insignis</i> -i14.CH-ECUAT...
<i>C. insignis</i> -E12.SD-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -i8.CH-ECUAG.....
<i>C. insignis</i> -i4.CH-ECUAG...	...G.....
<i>C. insignis</i> -P2.PA-ECUAG...	...G.....
<i>C. insignis</i> -P8.PQ-ECUAG.....

Haplotipo 1

Haplotipo 2

Haplotipo 3

Haplotipo 4

Haplotipo 5

Haplotipo 6

Haplotipo 7

<i>C. insignis</i> -D1074-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. insignis</i> -D1076-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.ACTG
<i>C. insignis</i> -D1077-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. insignis</i> -D1078-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. insignis</i> -D1079-GUAD	TAGAC..CTC	C.G.GG.CTG
<i>C. insignis</i> -D1080-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.ACTG
<i>C. insignis</i> -D1081-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. insignis</i> -D1082-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. insignis</i> -D1083-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. insignis</i> -D1084-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.ACTG
<i>C. insignis</i> -D1085-GUAD	TAGAC..CTC	C.G.G..C..
<i>C. insignis</i> -D1088-GUAD	TAGAC..CTC	C.G.GG.C..
<i>C. insignis</i> -D1091-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. insignis</i> -D1092-GUAD	TAGAC..CTC	..G.G.AC..
<i>C. fernandoi</i> -i2.CH-ECUA	T.....GA.C	C...G.A...

Tabla 5. Variabilidad nucleotídica de las secuencias alineadas de D1-D2 (683 pb) de especímenes de *C. insignis* de Ecuador (ECUA) e Isla de Guadalupe (GUAD); y especies del subgénero *Hoffmania* de Ecuador. Se presenta 16 sitios informativos. Los números en la parte superior, leyéndose de forma vertical, representan la posición del nucleótido en la secuencia. Los puntos (.) representan igualdad en la base nitrogenada, mientras que los guiones (-) representan deleciones o inserciones. Además se presenta 7 haplotipos en los especímenes *C. insignis* de Ecuador e Isla de Guadalupe.

Código espécimen	Secuencia	
	111244466 455018801 1518350153	666666 244588 827823
<i>C. insignis</i> -E10.SD-ECUA	AATTAATTG	GTGCTT
<i>C. insignis</i> -i11.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -i14.CH-ECUA
<i>C. insignis</i> -P4.PA-ECUA
<i>C. insignis</i> -P5.PE-ECUA
<i>C. insignis</i> -P7.PQ-ECUA
<i>C. insignis</i> -P8.PQ-ECUA
<i>C. insignis</i> -D1074-GUAD
<i>C. insignis</i> -D1076-GUAD
<i>C. insignis</i> -D1080-GUAD
<i>C. insignis</i> -D1081-GUAD
<i>C. insignis</i> -D1088-GUAD
<i>C. insignis</i> -D1092-GUAD
<i>C. insignis</i> -B1.CA-ECUAA..
<i>C. insignis</i> -E9.SD-ECUAA..
<i>C. insignis</i> -D1079-GUADA..
<i>C. insignis</i> -D1082-GUADA..
<i>C. insignis</i> -D1083-GUADA..
<i>C. insignis</i> -D1084-GUADA..
<i>C. insignis</i> -D1085-GUADA..
<i>C. insignis</i> -D1091-GUADA..
<i>C. insignis</i> -B4.EC-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -B5.EC-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -B6.EC-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -i5.CH-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -P2.PA-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -P6.PE-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -B2.CA-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -E7.SD-ECUAC.
<i>C. insignis</i> -i1.CH-ECUA	T.....	...C.
<i>C. insignis</i> -P1.PA-ECUA	T.....	...C.
<i>C. insignis</i> -D1077-GUADA
<i>C. insignis</i> -D1078-GUAD	T.....
<i>C. batesi</i> -D0451-ECUA	.CCCGG.CA.	T.G...
<i>C. diabolicus</i> -110-ECUA	.CCCGGACA.	T.G...
<i>C. fernandoi</i> -i2.CH-ECUA	...GG..A.
<i>C. filarifer</i> -8M-ECUA	.CC.GGAC..	C.G...
<i>C. foxi</i> -9-ECUA	...GG..A.	TCG..A
<i>C. guttatus</i> -77-ECUA	...GG--AA	C.GT..
<i>C. ocumarencis</i> -7J-ECUA	.CCCGGACA.	T.G...
<i>C. pusillus</i> -1J-ECUA	...GG..A	.CGTC.

14. Anexos

Anexo 1. Secuencia primers Lep F, Lep R, D1 y D2, fuente Hadj Henni, et al., 2014; y Slama, et al., 2014.

Primer	Secuencia
Lep F	5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3'
Lep R	5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3'
D1	5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3'
D2	5'-TCCGTGTTTCAAGACGGG-3'

Anexo 2. Reacción de PCR de 50µl del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), fuente Hadj Henni, et al., 2014.

Reactivos	Concentración inicial		Concentración final		Volumen para una reacción	
Buffer	5,00	X	1,00	X	10,00	µl
DNTPs	2,00	mM	0,20	mM	5,00	µl
MgCl ₂	25,00	mM	1,80	mM	3,60	µl
Lep F	50,00	µM	1,00	µM	1,00	µl
Lep R	50,00	µM	1,00	µM	1,00	µl
Go Taq promega	1,50	U/µl	0,15	U/µl	0,50	µl
H ₂ O	-		-		23,90	µl
ADN	-		-		5,00	µl
Volumen total					50,00	µl

Anexo 3. Condiciones de amplificación del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI), fuente Zapata, et al., 2012.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	3:00	1
94	0:30	4
45	1:00	
72	1:00	
94	0:30	34
51	0:30	
72	1:00	
72	10:00	1

Anexo 4. Reacción de PCR de 50 μ l del dominio D1-D2 del gen ribosomal 28S, fuente Vela, 2014.

Reactivos	Concentración inicial		Concentración final		Volumen para una reacción	
Buffer	5,00	X	1,00	X	10,00	μ l
DNTPs	2,00	mM	0,20	mM	5,00	μ l
MgCl ₂	25,00	mM	2,00	mM	4,00	μ l
D1	50,00	μ M	1,00	μ M	1,00	μ l
D2	50,00	μ M	1,00	μ M	1,00	μ l
Go Taq promega	1,50	U/ μ l	0,09	U/ μ l	0,06	μ l
H ₂ O	-		-		23,94	μ l
ADN	-		-		5,00	μ l
Volumen total					50,00	μ l

Anexo 5. Condiciones de amplificación del dominio D1-D2 del gen ribosomal 28S, fuente Gualapuro, 2013.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	3:00	1
94	0:30	39
58	1:30	
68	1:00	
72	10:00	1