



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Mosquitos de la zona litoral en la isla de Mallorca. Caracterización morfológica y molecular de especies.

Pere Antoni Forteza Joy

**Grau de Biologia**

Any acadèmic 2016-17

DNI del alumne: 43218949V

Treball tutelat per La professora D<sup>a</sup> Clàudia Caterina Paredes Esquivel  
Departament de Biologia

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
X		X	

Paraules clau del treball:

*Ochlerotatus mariae*, *Ochlerotatus caspius*, identificación, anàlisis genético, secuenciación, barcoding...



# Índice

1.Resumen.....	2
2.Abstract.....	2
3.Introducción.....	3
Género <i>Ochlerotatus</i>	
<i>Ochlerotatus caspius</i> y <i>Ochlerotatus mariae</i>	
Diferencias morfológicas a nivel de adulto	
Importancia como vector de <i>Oc. caspius</i>	
Importancia como vector de <i>Oc. mariae</i>	
Utilidad en el estudio de Culícidos del código de barras del ADN o “barcoding”	
4. Hipótesis y Objetivos.....	9
5.Metodología.....	10
Muestreo	
Desarrollo de las fases larvarias.	
Identificación morfológica de <i>Ochlerotatus mariae</i>	
Identificación morfológica de <i>Ochlerotatus caspius</i>	
Extracción ADN	
Cuantificación mediante NanoDrop	
Amplificación mediante PCR del gen mitocondrial citocromo C oxidasa I	
Purificación	
Secuenciación	
Análisis de las secuencias obtenidas	
6.Resultados.....	17
7.Discusión.....	24
8.Conclusiones.....	26
9.Bibliografía.....	27

## 1. Resumen

El estudio de culícidos, debido a su papel como vectores, es un tema de total actualidad en Europa. Este trabajo se centra en dos especies de Mallorca, muy similares morfológicamente, pero con capacidades vectoriales diferentes, se trata de *Oclerotatus caspius* y *Ochlerotatus mariae*. La primera de ellas está totalmente extendida y es muy común. La presencia de *Oc. mariae* no se confirmó hasta el año 2011, por lo que su estudio en Mallorca es muy reciente. En este trabajo se pretende muestrear nuevamente *Oclerotatus mariae* en la costa rocosa del sur de la isla, realizar una identificación morfológica exhaustiva de ambas especies y finalmente llevar a cabo un estudio genético basado en la secuenciación de una sección corta de ADN. El objetivo principal es esclarecer la relación entre ambas especies.

Se consiguió muestrear larvas de *Oc. mariae* en acumulaciones de agua salada y la identificación morfológica de ambas especies se llevó a cabo sin encontrar individuos que no cumplieran con las características descritas, sin embargo, sí se observó que el mal estado de conservación de los individuos puede inducir a errores en la identificación. Para el estudio genético se incluyeron individuos de *Oc. mariae* procedentes de Valencia, con el objetivo de comparar poblaciones. Este estudio genético aportó resultados contradictorios, la amplificación y secuenciación del gen de interés fue un éxito y se observaron diferencias entre las poblaciones de *Oc. mariae* de Mallorca y la de Valencia. Además, se reportó una posible hibridación entre *Oc. mariae* y *Oc. caspius* en Mallorca. Sin embargo, no se pudo realizar un árbol filogenético suficientemente demostrativo estadísticamente para esclarecer la relación entre ambas especies. Estos resultados no permiten llegar a una conclusión definitiva al respecto, pero nos obligan a seguir investigando la relación entre las dos especies e intentar esclarecer si efectivamente se está produciendo una hibridación entre ambas.

## 2. Abstract

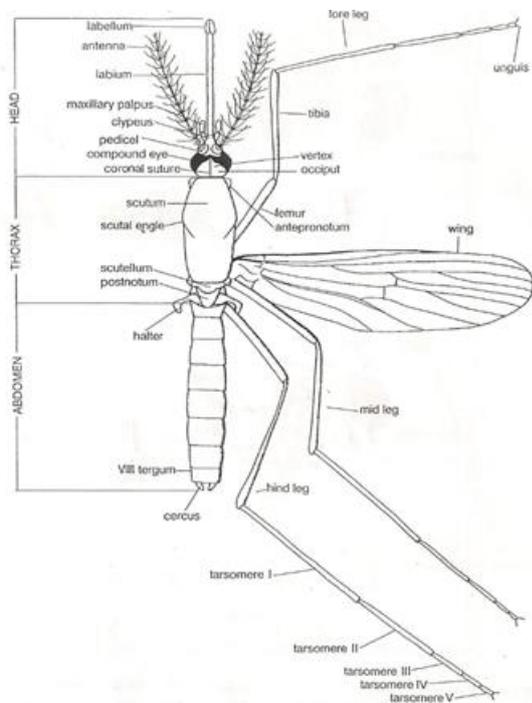
The study of culicids, due to its role as vectors, is a subject of total actuality in Europe. This work focuses on two species of Majorca, very similar morphologically, but with different vectorial capacities, these are *Oclerotatus caspius* and *Ochlerotatus mariae*. The first one is fully extended and is very common. The presence of *Oc. Mariae* was not confirmed until 2011, so its study in Mallorca is very recent. In this study, we will try to sample *Oclerotatus mariae* again on the southern rocky coast of the island, carry out an exhaustive morphological identification of both species and finally carry out a genetic study based on the sequencing of a short section of DNA. The main objective is to clarify the relationship between both species.

The sampling of *Oc. Mariae* larvae was a success and the morphological identification of both species was carried out without finding samples that did not comply with the described characteristics, however, it was observed that the poor state of conservation of the samples can induce errors in the identification. For the genetic study, we add samples of *Oc. mariae* from Valencia, with the aim of comparing populations. This genetic study provided contradictory results, the amplification and sequencing of the gene of interest was a success and we observed differences between *Oc. mariae* populations of Mallorca and Valencia. In addition, it was proposed a hybridization between *Oc. mariae* and *Oc. caspius* in Mallorca. However, it was not possible to perform a phylogenetic tree with statistical validity to clarify the relationship between both species. These results do not allow us to achieve a definitive conclusion, but they force us to continue investigating the relationship between the two species and try to clarify if there is a hybridization between them.

### 3.Introducción

Los dípteros son un orden de insectos que poseen dos alas membranosas conocidas como halterios, de ahí el origen de su nombre. Hay más de 150.000 especies, entre las que destacan moscas, mosquitos y tábanos, entre muchas otras (Reinert, 2001). La filogenia de este orden no está nada clara y aún es motivo de estudio hoy en día, las divisiones son parafiléticas o polifiléticas, por lo que no tienen una clasificación linneana (Borror, 1976).

Clásicamente se contemplaban los subórdenes Nematóceras y Brachycera, sin embargo, actualmente es más común añadir a estos dos los subórdenes Cyclorhapha y Schizophora. Los nematóceros tienen antenas largas, a menudo plumosas y con muchos segmentos. Los braquíceros tienen cuerpos más redondeados y antenas muy cortas (Wiegman, 2012). Dentro del suborden Nematóceras encontramos la familia de los culícidos (Culicidae), conocidos coloquialmente como mosquitos. Existen unos 39 géneros con más de 3500 especies (Reinert, 2001). Entre estos géneros destacan *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Sabethes* o *Ochlerotatus*, entre otros.



**Figura 1:** Vista general de una hembra de Culicido. En *Mosquitoes and their Control*, por Becker, N. et al (2003). Ed. Springer.

#### **Género *Ochlerotatus***

El género *Ochlerotatus* anteriormente formaba parte del género *Aedes*, pero a partir del año 2000 se convirtió en un género propio basándose en características taxonómicas (Reinert, 2001). Sin embargo, no todos los autores están a favor de esta conversión, Savage & Strickman (2004) dieron argumentos contrarios a la separación.

Los especialistas en sistemática siguen divididos en cuanto a esta conversión y aún no hay una forma totalmente aceptada. No obstante, en este trabajo consideraremos como correcta la clasificación de género para *Ochlerotatus*. La monofilia de *Ochlerotatus* es cuestionable, ya que muchas especies no se pueden colocar en ninguno de los subgéneros actualmente reconocidos (Reinert *et al.*, 2004). Se estiman unas 197 especies en total y 30 subgéneros

reconocidos que abarcan 73 de estas especies, 123 especies siguen sin clasificación subgenérica. *Ochlerotatus* es un grupo grande y abundante con especies en todas las áreas templadas, subtropicales y tropicales del mundo. La mayor diversidad de especies se da en las regiones australiana, neártica y neotropical.

### ***Ochlerotatus caspius* y *Ochlerotatus mariaae***

Las dos especies en las que nos centramos son *Ochlerotatus caspius* y *Ochlerotatus mariaae*. La primera fue descrita en 1771 por Pallas y la segunda fue descrita por Sergent & Sergent en 1903.

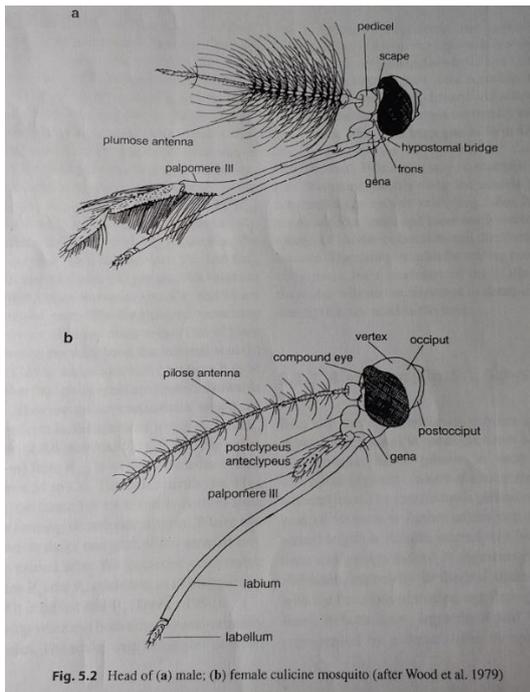
*Ochlerotatus caspius* es una especie paleártica (Stone *et al.*, 1959) frecuente tanto en zonas de litoral con alto grado de salinidad, como en márgenes de río o zonas de regadío encharcadas (Senevet & Anderelli, 1964). Habita toda la región mediterránea, Gran Bretaña, Europa, Rusia, Mongolia, norte de China, Pakistán, África noreste, Asia Menor y Golfo Pérsico (Cranston & Snow, 1987). La primera cita de esta especie en España fue en 1912 (Encobet, 1912), ha sido citada en numerosos estudios de forma continuada y es común en las Islas Baleares (Melero *et al.*, 2006). Por lo tanto, su presencia en Mallorca está más que confirmada y establecida, incluso ha llegado a causar algunos problemas por su abundancia, ya que, al tratarse de un mosquito antropofílico, los casos de picaduras son abundantes especialmente a principios de primavera (Miranda, 2010).

*Oc. mariaae* es una de las tres especies alopátricas que forma parte del complejo *mariaae*, junto con: *Oc. zammitii* (Theobald, 1903) y *Oc. phoeniciae* (Coluzzi & Sabatini, 1968). Estos pueden ser separados por características morfológicas y moleculares (Becker *et al.*, 2003). *Oc. mariaae* es una especie típica del Mediterráneo Occidental (Coluzzi *et al.*, 1971). Sus registros en España son escasos y se limitaban a las zonas de Girona, Barcelona, Tarragona y Murcia (Bueno & Jiménez, 2011). La confusión con *Oc. zammitii* puede haber reducido el número de casos en que ha sido descrita, por eso según los criterios de Eritja *et al.* (2000), las identificaciones españolas de *Oc. zammitii* (Gil Collado, 1932, 1935; Nájera, 1943; Clavero, 1946), deben atribuirse a *Oc. mariaae*.

La presencia en las Islas Baleares no estaba clara. Según Torres Cañamares (1979), citando a Margalef (1949), solo había un informe en 1926 de la captura de dicha especie. Sin embargo, este registro no era nada claro, ya que en estudios posteriores (Grandes, 1982; Eritja *et al.*, 2002; MOTAX, 2011) no se encontró dicha especie. En 2011 se confirmó la presencia de la especie en la costa de Ses Salines, en el sur de Mallorca. Todos los individuos fueron encontrados en charcos de agua marina próximos a la costa (Bueno & Jiménez, 2011). Este dato contrasta con las campañas anteriores ya mencionadas, en las que no se encontró ningún individuo. Por este motivo no se tiene nada claro si ha llegado recientemente a Mallorca o, por el contrario, ya se encontraba en la isla, pero no había sido registrada en ningún estudio anterior.

### **Diferencias morfológicas a nivel de adulto**

Las diferencias morfológicas entre ambas especies son mínimas y la confusión entre una y otra es habitual. Para este trabajo nos basaremos en las instrucciones de Becker *et al.* (2003) en Mosquitoes and their control. En primer lugar, se debe comentar que esta clave es para individuos femeninos. Los sexos de los mosquitos se distinguen por las antenas, las de los machos son bastante plumosas, mientras que las hembras tienen antenas esbeltas, casi desnudas.

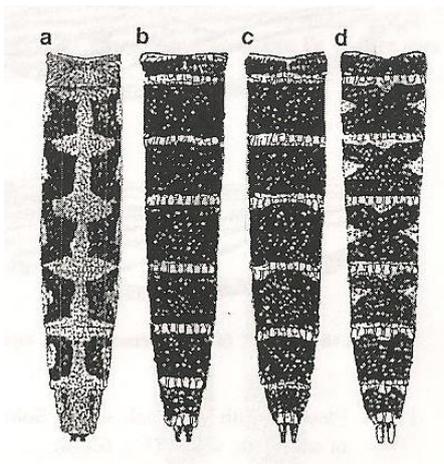


**Figura 2:** Diferencias entre machos y hembras de Culícidos a nivel de antenas. En *Mosquitoes and their Control*, por Becker, N. et al (2003). Ed. Springer.

Siguiendo la clave comentada, llegamos hasta el punto en que se diferencian ambas especies:

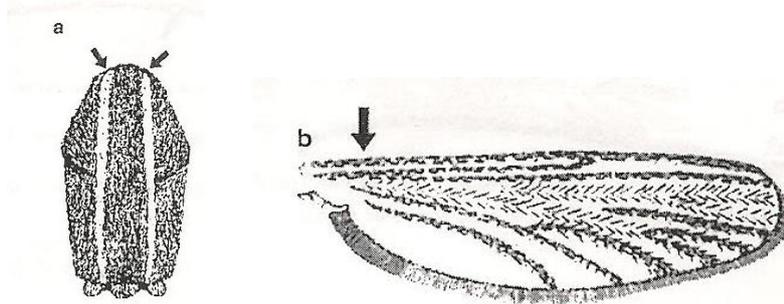
-Abdomen sin una banda central longitudinal pálida. Las escamas pálidas forman estrechas bandas transversales basales de patrón variable. (b-d) → *Oc. mariae*

-Abdomen con una banda central longitudinal pálida. El último segmento a veces casi completamente cubierto con unas escamas pálidas. (a) → *Oc. caspius*



**Figura 3:** Diferencias en el abdomen. En *Mosquitoes and their Control*, por Becker, N. et al (2003). Ed. Springer.

-Escutelo coloreado con dos estrechas franjas blancas dorsocentrales que alcanzan el margen posterior (a). Venas de las alas con escamas oscuras y pálidas más o menos uniformemente mezcladas (b). → *Oc. caspius*



**Figura 4:** Escutelo y alas de *Oc. caspius*. En *Mosquitoes and their Control*, por Becker, N. et al (2003). Ed. Springer.

#### **Importancia como vector de *Oc. caspius***

Según la OMS las enfermedades vectoriales representan un 17% de la carga mundial estimada de enfermedades infecciosas, la mayoría de vectores son insectos y principalmente Culícidos. Se estima que aproximadamente 3200 especies de mosquitos tienen capacidad vectorial, de ahí su importancia en la caracterización e identificación de especies. La enfermedad vectorial más mortífera es la malaria, que causó 627.000 muertes en 2012. No obstante, la enfermedad de este tipo con mayor crecimiento en el mundo es el dengue, cuya incidencia se ha multiplicado por 30 en los últimos 50 años.

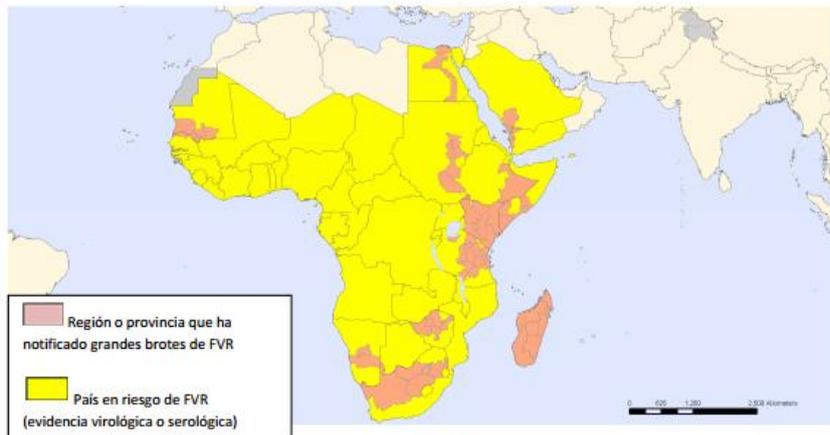
La creciente inmigración a Europa de personas que viven en zonas de riesgo para algunas de estas enfermedades ha provocado una enorme preocupación, ya que la posible llegada de estas enfermedades es una realidad. Cabe recordar que en Europa disponemos de vectores para estas enfermedades y por ese motivo, el estudio de estos es fundamental. Especies que ahora no tienen ningún peligro como vectores, debido a que la enfermedad no se encuentra presente, podrían actuar como tal en un futuro próximo con la llegada de los agentes infecciosos.

El género *Ochlerotatus* es un vector potencial de diversos patógenos humanos, como *Spiroplasma sabaudiense* (LeGoff *et al.*, 1990) y *Crisiulospira aedis* (Khodzhaeva & Issi, 1989). Centrándonos en las dos especies de interés, observamos que el vector más importante del virus Tahyna en Europa es *Oc. caspius* (Bennet, 2011). Este virus conocido como “TAHV” es un patógeno humano clasificado en el serogrupo de la encefalitis de California (CEV). Las infecciones humanas por TAHV generalmente ocurren en verano y principios del otoño, con síntomas de fiebre, dolor de cabeza, malestar general, conjuntivitis, faringitis y náuseas. La enfermedad puede progresar para involucrar al sistema nervioso central, pero no se han reportado muertes (Bennet, 2011).

También es un vector potencial de La fiebre del Valle del Rift (FVR) (Gad *et al.* 1999; Hubalek y Halouzka, 1999; Balenghien *et al.*, 2006). Dicho virus se ha detectado en el sur de Francia desde el año 2000, después de 35 años de ausencia de la enfermedad (Balenghien *et al.*, 2006). Aunque *Culex modestus* es considerado el vector principal en Francia, recientes transmisiones sugieren la existencia de otros posibles vectores, siendo *Oc. caspius* uno de ellos (Balenghien *et al.*, 2006).

Además, se considera uno de los vectores responsables del mantenimiento del virus en Egipto durante los periodos inter-epizoóticos, así como uno de los vectores más eficientes en la epidemia de 1993 (Turell, 1996; Gad *et al.*, 1999).

La fiebre del Valle del Rift (FVR) es una zoonosis viral que afecta principalmente a los animales, pero también tiene la capacidad de infectar a los seres humanos (Sissoko, 2009). Se han notificado multitud de brotes en África. La primera aparición de la enfermedad fuera del continente africano causó preocupación, ya que podría extenderse a otras partes de Asia y Europa (OMS, 2013).



Fuente: OMS

**Figura 5:** Distribución Geográfica de los brotes de FVR en 2013.

Organización Mundial de la Salud. Fiebre del Valle del Rift. Nota descriptiva No 207 (2013), <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/es/>

La mayoría de las infecciones humanas resultan del contacto directo o indirecto con la sangre o los órganos de los animales infectados, sin embargo, el papel de los mosquitos vectores también es destacable en la propagación de la enfermedad. Según el Informe de Situación y Evaluación del Riesgo para España de la Fiebre del Valle del Rift de mayo de 2014, el riesgo de llegada de la enfermedad es bajo, pero si llegara el agente infeccioso habría condiciones tanto vectoriales como ambientales para la dispersión de la enfermedad.

### **Importancia como vector de *Ochlerotatus mariae***

Desde el punto de vista veterinario se ha reportado la posible transmisión del parásito aviar *Plasmodium relictum* por *Oc. mariae* (Gutsevich *et al.*, 1974). Este plasmodio se trata de un protista de la familia Plasmodiidae y es causante de la malaria aviar, que puede ser mortal para algunas especies. Tal es su importancia que la podemos encontrar entre la lista de 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo (Lowe *et al.*, 2004). Esta enfermedad afecta principalmente a las aves del orden paseriformes.

Se han reportado casos muy graves en los que esta enfermedad ha afectado notablemente a las aves nativas de algunas islas, como en el caso de Hawái. Además, se ha observado que las aves nativas de las islas son más susceptibles que las introducidas y exhiben una mortalidad mayor (Van Riper *et al.* 1982; Atkinson *et al.* 1995). Incluso se ha atribuido a *P. relictus* la distribución de muchas de estas especies y la extinción de algunas especies en las zonas donde hay más presencia de mosquitos vectores (Warner 1968; Van Riper 1991; USDI & USGS, 2005).

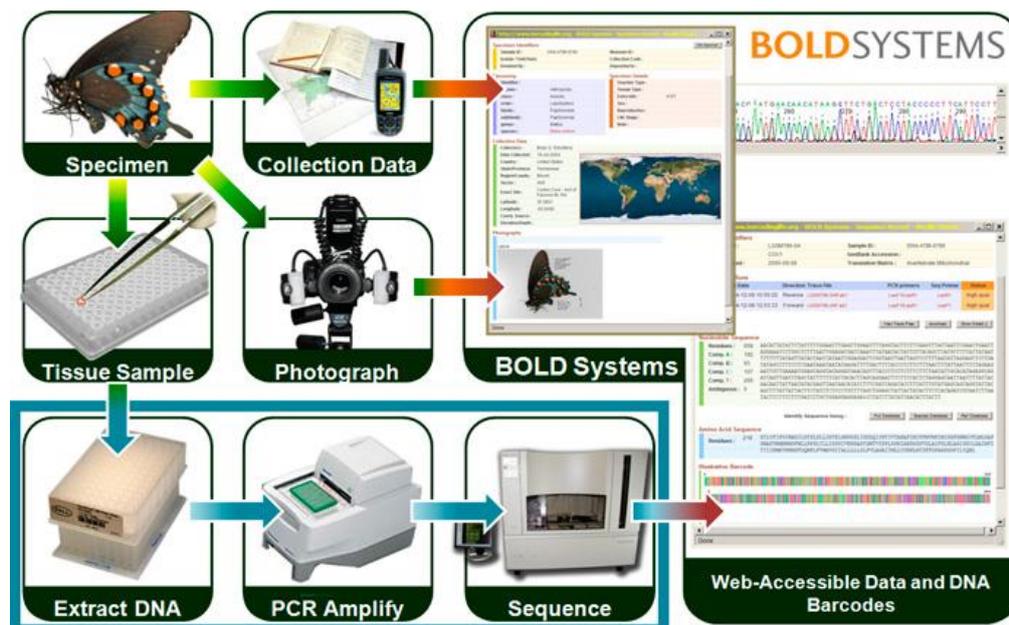
Debido a que esta especie se desarrolla en los charcos de agua salada cercanos a la costa y que en la isla de Mallorca encontramos muchos kilómetros de costa rocosa, la necesidad de incluir *Oc. mariae* en programas de control de mosquitos es evidente (Bueno & Jiménez, 2011). Aunque no hay casos de *Plasmodium relictum* en la isla hay que tener en cuenta que la llegada, aunque difícil no es imposible y que gracias a *Oc. mariae* la distribución sería posible.

**Utilidad en el estudio de Culícidos del código de barras del ADN o “barcoding”.**

En el año 2003 un grupo liderado por Paul Herbert propuso un nuevo sistema de identificación y descubrimiento de especies usando una sección corta de ADN de una región estandarizada del genoma. Este sistema defiende que la identificación debe ir más allá de los caracteres morfológicos y que el uso de secuencias estandarizadas de ADN como códigos de barras de taxones debe implementarse en la ciencia actual (Hebert *et al.*, 2003).

Se estableció que el gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) puede servir como núcleo de un sistema de bioidentificación global. Esta región de 648 pares de bases resulta muy eficaz en la identificación. La ventaja de usar COI es que es lo suficientemente corta para ser secuenciada de forma rápida y barata, pero al mismo tiempo, lo suficientemente larga para identificar variaciones entre especies. Presenta una alta tasa de sustitución, lo que se manifiesta en alta variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003). Se usa una pequeña muestra de tejido del espécimen para extraer su ADN. La región de código de barras es aislada, luego replicada utilizando un proceso denominado amplificación por PCR y luego es secuenciada. Una vez que se ha obtenido la secuencia de código de barras de ADN, se introduce en una base de datos que puede ser consultada globalmente.

Investigadores de todo el mundo pueden llevar a cabo la replicación y posterior secuenciación del mismo fragmento de los especímenes que están investigando. Una vez tienen la secuencia la pueden introducir en esta base de datos para saber de qué especie se trata. Si bien esta técnica es apropiada para la mayoría de grupos de animales, existen dificultades en usar este gen para identificar especies de algunos grupos.



**Figura 6:** Esquema sobre el proceso de introducir una secuencia en la base de datos BOLD. Museo de Historia Natural. Código de Barras del ADN. <http://pebol.org/codigo-de-barras/>

El desarrollo de códigos de barra de ADN no excluye a la taxonomía, que se basa en caracteres morfológicos diagnósticos. Por el contrario, se presenta como una herramienta complementaria basada en técnicas de biología molecular para la correcta identificación de las especies (Padial & De la Riva, 2007).

Esta herramienta ha sido usada en multitud de casos para identificación de insectos. Más concretamente, se ha usado para la identificación de varias especies de *Aedes* y *Ochlerotatus* (Cywinska *et al.*, 2006).

Como hemos comentado antes, en muchas ocasiones las diferencias morfológicas entre especies de Culícidos son mínimas. El uso de la identificación gracias a la secuenciación de la región COI es una herramienta muy útil para la correcta identificación de culícidos. Además, esta herramienta también permite identificar nuevas especies o poblaciones que están en proceso de especiación, ya que podemos comparar las secuencias de diferentes regiones para esclarecer si se está produciendo un proceso de especiación o similar.

## 4. Hipótesis y Objetivos

La importancia de este estudio reside en el hecho de unir dos técnicas para la identificación y comparación filogenética de especies. Por un lado, se lleva a cabo la identificación morfológica tradicional y, por otro lado, el estudio genético mediante la secuenciación de una región estandarizada del genoma. No se pretende excluir o desacreditar ninguna de las dos técnicas, sino demostrar que es imprescindible el uso de ambas para obtener una mayor veracidad a la hora de identificar o describir especies tanto nuevas como ya descubiertas.

La hipótesis propuesta es que ambas especies son diferentes morfológicamente, aunque con diferencias mínimas que pueden llevar a confusiones y errores. Sin embargo, con el estudio genético se puede esclarecer por completo la relación filogenética entre ellas. Aunque están descritas como especies diferentes, cabe la posibilidad de que se esté dando a cabo una hibridación entre ambas en Mallorca y que por lo tanto se trate de especies sinónimas.

### Objetivos:

- Confirmar mediante el muestreo la presencia de *Ochlerotatus mariaae* en la costa rocosa del sur de Mallorca.
- Determinar, describir y diferenciar morfológicamente tanto *Ochlerotatus mariaae* como *Ochlerotatus caspius*.
- Extraer material genético de ambas especies y amplificar el gen mitocondrial citocromo C oxidasa I.
- Comparar las secuencias de *Ochlerotatus mariaae* de la población de Mallorca con las secuencias obtenidas de Valencia.
- Gracias a la secuenciación del gen mitocondrial citocromo C oxidasa I de ambas especies y el posterior análisis de los datos, esclarecer la relación filogenética y el grado de coincidencia genética entre ambas especies. Así mismo intentar averiguar si actualmente se está produciendo un proceso de hibridación entre ambas especies en Mallorca.
- Realizar un árbol filogenético entre las muestras de *Ochlerotatus mariaae* de Mallorca y Valencia juntamente con las muestras de *Ochlerotatus caspius*.

## 5. Metodología

### Muestreo

En primer lugar, se llevó a cabo el muestreo de especímenes de *Oc. mariae*. El día 14 de octubre de 2016 nos dirigimos a la zona de muestreo, el Far de S'Estalella, siguiendo los criterios de Bueno & Jiménez 2011, ya que se trata de una zona rocosa y con abundantes acumulaciones de agua salada. Las coordenadas exactas fueron (N 39°21'10.1''/ E 2°54'46.04'') y podemos observar la localización en la figura 7.

Los especímenes se recolectaron de 3 acumulaciones de agua salada diferentes, cabe mencionar que el muestreo solo se llevó a cabo de larvas, usando pipetas para capturarlas y transportándolas en botes de plástico rellenos con la propia agua salada.



**Figura 7:** Localización de la recolección de *Oc. mariae*. Imagen extraída de <https://www.google.es/maps/>



**Figura 8:** Fotografías de Pere Antoni Forteza (Faro de S'Estalella. 2016) de dos de las acumulaciones de agua salada muestreadas.

### Desarrollo de las fases larvarias.

Ya en la universidad se introdujeron las larvas en larvarios para que se desarrollaran y así poder identificar los adultos. Estos larvarios fueron etiquetados y guardados en el insectario.



**Figura 9:** Fotografías de Pere Antoni Forteza (Insectario UIB. 2016). Larvarios usados para el desarrollo a adulto de las larvas capturadas.

El día 24 de octubre ya se habían desarrollado todas las larvas, se sacrificaron los adultos mediante congelación y se conservaron en eppendorfs debidamente esterilizados en autoclave. En cada eppendorf se introdujeron 2 mosquitos y se conservaron en el congelador para la posterior identificación. En total se obtuvieron 72 mosquitos para la identificación.

### **Identificación morfológica de *Ochlerotatus mariaae***

Se realizó primero una identificación rápida de los mosquitos siguiendo el criterio de Becker *et al.* (2003). Ante el reducido número de especímenes de *Oc. mariaae* para la revisión morfológica exhaustiva, se realizó también la revisión morfológica de especímenes recolectados con anterioridad por David, del propio departamento de zoología de la universidad.

Usando una lupa de aumentos con cámara incorporada para la realización de fotografías y siguiendo la clave de determinación comentada, se fueron comprobando una a una todas las características morfológicas que debían presentar los individuos.

También se realizaron fotografías de cada individuo y se apuntaron las posibles incidencias observadas. Además, se comprobó y apuntó el sexo de cada uno. En total se observaron 25 especímenes, los 4 recolectados en S'Estelella más 21 recolectados por el departamento en S'Estanyol, una zona muy cercana.

### **Identificación morfológica de *Ochlerotatus caspius***

Una vez acabada la identificación de *Oc. mariaae* se procedió a llevar a cabo la revisión morfológica exhaustiva de 25 especímenes de *Oc. caspius*. Estos especímenes fueron recolectados el 3 y 4 de noviembre de 2016 en una zona cercana a la base aérea de Mallorca por Carlos Barceló. Se siguieron exactamente los mismos pasos que en el caso anterior, se observaron los especímenes en la lupa y se comprobó, paso a paso, que correspondían morfológicamente con el criterio de Becker *et al.* (2003). Se tomaron fotografías de la mayoría de especímenes y se apuntaron las posibles incidencias observadas.

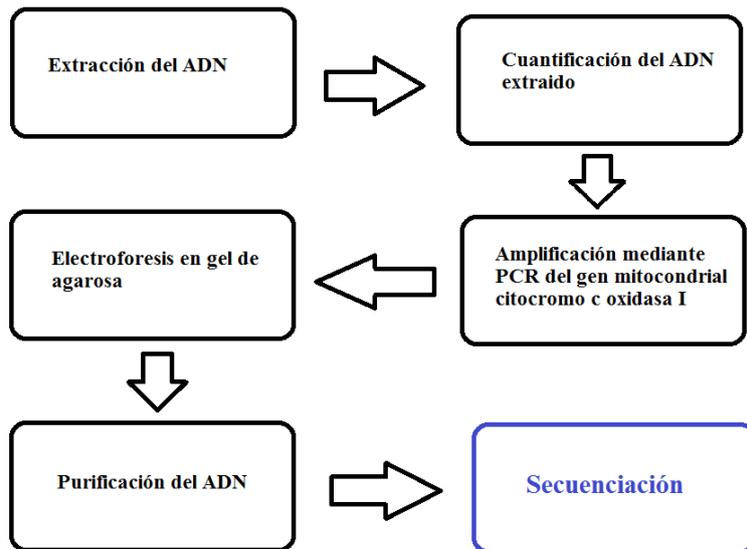
A continuación, se llevó a cabo la identificación y secuenciación mediante “barcoding” de algunos de estos individuos. Además, se añadieron una serie de muestras de *Oc. mariaae* procedentes de Valencia, enviadas por Rubén Bueno Marí, del Instituto de la Biodiversidad y Biología Evolutiva de la Universidad de Valencia. Aparte, también se añadieron dos larvas de *Oc. mariaae* recolectadas e identificadas por Carlos Barceló en Betlem (Mallorca).

En la Tabla 1 podemos ver la información detallada de cada una de las 14 muestras que se usaron en esta parte del trabajo. Estas 14 muestras se colocaron individualmente en eppendorfs esterilizados y se suspendieron en etanol al 70%. Se conservaron en la nevera hasta el momento de la extracción del ADN.

Código	Fecha recolección	Especie	Procedencia	Colector	Estadio
Mb75	27/4/2017	<i>Oc. mariae</i>	Valencia	-	Adulto
Mb76	27/4/2017	<i>Oc. mariae</i>	Valencia	-	Adulto
Mb77	-	<i>Oc. mariae</i>	Valencia	-	Larva
Mb78	-	<i>Oc. mariae</i>	Valencia	-	Larva
Mb79	13/10/2016	<i>Oc. mariae</i>	S'estanyol	David	Adulto
Mb80	13/10/2016	<i>Oc. mariae</i>	S'estanyol	David	Adulto
Mb81	13/10/2016	<i>Oc. mariae</i>	S'estanyol	David	Adulto
Mb82	13/10/2016	<i>Oc. mariae</i>	S'estanyol	David	Adulto
Mb83	-	<i>Oc. mariae</i>	Betlem	Carlos	Larva
Mb84	-	<i>Oc. mariae</i>	Betlem	Carlos	Larva
Mb85	04/11/2016	<i>Oc. caspius</i>	Base aérea	Carlos	Adulto
Mb86	04/11/2016	<i>Oc. caspius</i>	Base aérea	Carlos	Adulto
Mb87	04/11/2016	<i>Oc. caspius</i>	Base aérea	Carlos	Adulto
Mb88	04/11/2016	<i>Oc. caspius</i>	Base aérea	Carlos	Adulto

**Tabla 1:** Datos recopilados de todos los individuos que se usaron para la parte genética del trabajo.

El proceso que se siguió para llegar a obtener las secuencias de las muestras es el siguiente:



**Figura 10:** Esquema del proceso que se llevó a cabo para obtener las secuencias a partir de los individuos.

### Extracción ADN

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo siguiente: Purification of Total ADN from Animal Tissues (Spin-Column Protocol).

Se quitó el etanol en el que estaban suspendidos los individuos y se resuspendieron en agua destilada unos minutos, para limpiarlos. Se retiró el agua y se añadieron 180µl de buffer ATL a cada uno de los eppendorfs, luego se añadieron 20µl de proteinasa K y se machacaron durante unos 3 minutos dentro de los propios eppendorfs. A continuación, se dejaron sumergidos en agua a 56,0 °C durante unas 12 horas aproximadamente.

Al día siguiente, se vortearon unos 15 segundos, se añadieron 200µl de etanol al 100% y 200µl de buffer AL. Se volvieron a vortear otros 15 segundos. A continuación, se pipeteó el total de cada eppendorf y se traspasó a la DNeasy Mini spin column colocada en un tubo de 2ml de colección, se centrifugaron 1 minuto a 8.000 rpm. Una vez centrifugados, se descartó el tubo de colección y se colocó la DNeasy Mini spin column en un nuevo tubo de colección, se añadieron 500µl de AW1 y se centrifugaron 1 minuto a 8.000 rpm. Se repitió exactamente el mismo proceso anterior, pero se añadieron 500µl de AW2 en lugar de AW1 y se centrifugaron 3 minutos a 14.000 rpm. Se retiró el tubo de colección, se colocaron en uno nuevo y se volvieron a centrifugar 3 minutos a 14.000 rpm.



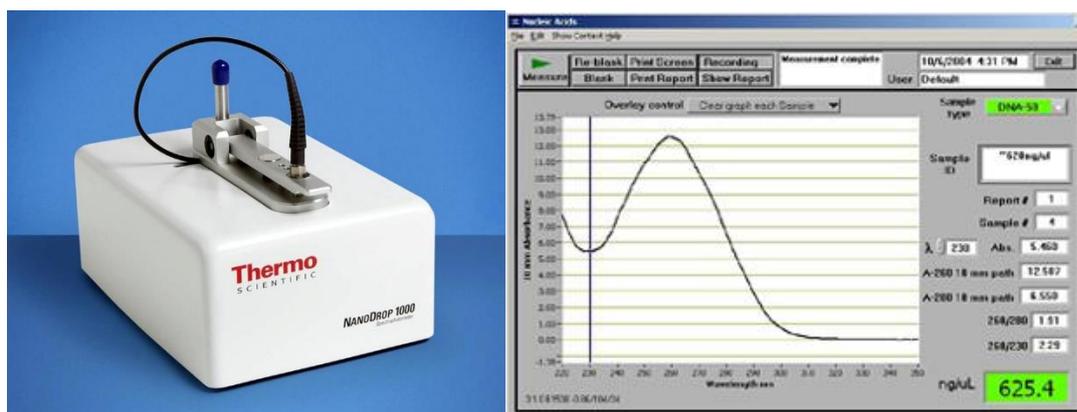
**Figura 11:** Ejemplo de DNeasy Mini spin column con tubo de colección. Imagen extraída de [http://www.enzymax.net/columns/mini\\_column\\_DNA.htm](http://www.enzymax.net/columns/mini_column_DNA.htm)

Posteriormente, se colocó la DNeasy spin column en otro tubo de colección y se pipetearon 100µl de buffer AE directamente sobre la membrana de la columna, se dejó reposar un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 8.000 rpm. Finalmente se pipeteó el contenido del tubo de recolección y se traspasó a un eppendorf. Se conservó en el congelador debidamente etiquetado hasta el siguiente paso, la cuantificación mediante NanoDrop.

### Cuantificación mediante NanoDrop

El NanoDrop es un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm) que mide concentraciones con muy poca cantidad de muestra y con gran exactitud. Usa la tensión superficial para contener las muestras y así se eliminan las cubetas de medida. El software calcula automáticamente la concentración de ácidos nucleicos, sabiendo que 50 µg de ADN/ml tienen una absorbancia de 1 a una longitud de onda de 260 nm. El software hace los cálculos con esta relación para obtener los ng de ADN por µl de muestra.

Esta cuantificación permite comprobar si la extracción de ADN ha funcionado correctamente. En primer lugar, se limpió la superficie de lectura del NanoDrop con 2 µl de agua destilada. A continuación, se realizó la lectura del blanco, 2 µl de tampón buffer AE ya que el ADN se encuentra suspendido en este. Antes de la lectura de cada muestra, esta fue homogenizada con el vórtex. Finalmente, se colocaron 2 µl de muestra para la lectura. Así, se obtuvieron los resultados en ng de ADN/ µl para cada una de las 14 muestras. Estas muestras se volvieron a guardar en el congelador hasta llevar a cabo la Amplificación mediante PCR.



**Figura 12:** Fotografía del NanoDrop y los resultados que se obtienen con este. Imagen extraída de <http://gcf.uta.edu/Nanodrop.html>

### Amplificación mediante PCR del gen mitocondrial citocromo C oxidasa I

Una vez comprobado que la cantidad de ADN de la extracción era suficiente, se procedió a amplificar el gen de interés.

Para amplificar el gen mitocondrial que nos interesa, es necesario llevar a cabo una PCR. En primer lugar, se preparó el mix. Estos son los volúmenes necesarios para preparar el mix de una única muestra, por lo que debemos multiplicarlos por el número de muestras y tener en cuenta que debemos preparar también para el control positivo y negativo.

H <sub>2</sub> O mili Q.....	18,6 µl	Fw C1 J.....	4µl
Buffer.....	4 µl	Rv C1 N.....	4 µl
DNTPs.....	3,2µl	MgCl <sub>2</sub> .....	4µl

Taq Polymerase.....0,2 µl

Luego se traspasaron 2 µl del producto de la extracción de ADN de cada muestra a un microtubo y una vez tenemos el mix preparado, traspasamos 38 µl a cada uno de los microtubos. Así se obtuvo un volumen de reacción de 40 µl. En este caso, se usaron los primers Sigma C1-J-1718 como forward y el Sigma C1-N-2191 como reverse, en una concentración de 10 µM. Estos son específicos para el gen que nos interesa, así al acabar la PCR, solo tenemos la porción de ADN que queremos amplificada.

Además de las muestras, se preparó un Control Negativo en el que solo había mix y un control positivo en el que se añadieron 2 µl de una muestra de *Culex pipiens* que ya había dado resultados positivos en otros estudios (mb41).

A continuación, se llevaron los microtubos al termociclador y se programaron 35 ciclos a las siguientes temperaturas y tiempos:

$$95^{\circ}\text{C} * 5' + 92^{\circ}\text{C} * 2'15'' \left| + 92^{\circ}\text{C} * 30'' + 50^{\circ}\text{C} * 30'' + 72^{\circ}\text{C} * 30' + \right| 72^{\circ}\text{C} * 1'$$

Al final, las muestras se quedaron reposando a 4°C hasta que fueron retiradas. Una vez retiradas, se conservaron en el congelador hasta la realización de la electroforesis.

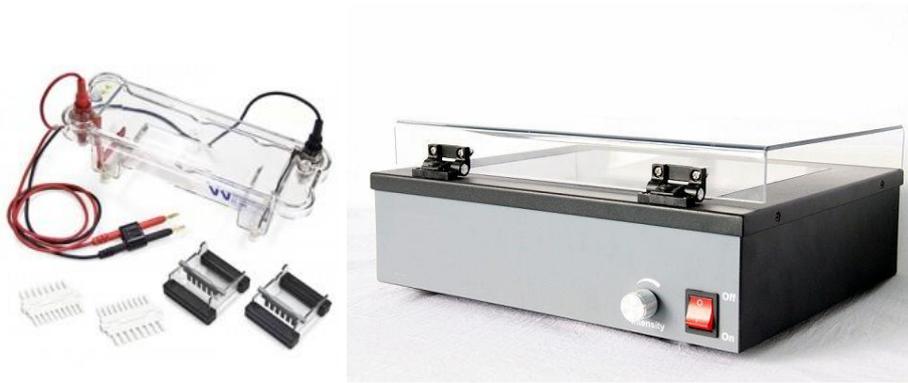
### **Electroforesis en gel de agarosa**

Una vez realizada la PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para comprobar si la PCR había funcionado correctamente. Deberíamos obtener muchas réplicas del gen de interés, con una longitud de unos 500 pb.

Se preparó un gel de agarosa al 1,7% de concentración. Primero se añadieron 3 g de agarosa a 150 ml de TBE en una concentración 1M. A continuación, se calentó la mezcla en un microondas un par de veces hasta que ya no se observaban burbujas y la agarosa estaba bien disuelta. Se dejó enfriar hasta unos 50-60 °C y se añadieron 7,5 µl de pronasafe, un sustituto del bromuro de etidio que cumple su misma función, se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente con luz ultravioleta.

Se vertió toda la mezcla en el soporte y se colocó el peine para la formación de los pocillos. Se dejó enfriar 45 minutos, luego se retiró el peine y se colocó la bandeja con el gel dentro de la cubeta con los pocillos en la zona del cátodo. Se añadió TBE a la cubeta hasta que cubriera el gel por completo.

Se pusieron alícuotas de loading dye de 1 µl sobre un parafilm, luego se añadieron 6 µl de cada muestra sobre las alícuotas, se pipetearon los 7 µl totales y se colocaron en cada uno de los pocillos. En el primer pocillo, en lugar de 6 µl de muestra, se añadieron 6 µl de DNA Leader que sirve como marcador para saber el tamaño de las bandas que se formarán. Una vez cargados todos los pocillos, se conectaron los cables del cátodo y del ánodo y se puso a 120 Voltios durante 1 hora. Una vez transcurrida la hora se apagó y se retiró el gel. Este se colocó sobre el lector de luz ultravioleta para visualizar las bandas formadas.



**Figura 13:** Ejemplo de cubeta para electroforesis y lector de luz ultravioleta similares a los usados. Imagen extraída de <http://www.ehu.eus/~ggppegaj/antropogenetica/Practicas/PracticaL5/agenetPractL5.htm>

Las muestras se guardaron en el congelador hasta la purificación. Hay que recordar que en la electroforesis solo se usa una parte de las muestras obtenidas de las PCR, el resto será el que posteriormente se purificará y se enviará a secuenciar.

### **Purificación**

Se decidió que solo se enviarían 10 muestras a secuenciar y por este motivo, solo se realizó la purificación de estas.

Las 10 muestras se eligieron según los resultados de la electroforesis y según que muestras eran de más interés para el estudio. Se purificaron y secuenciaron 8 muestras de *Oc. mariae* y 2 muestras de *Oc. caspius*. Las muestras fueron las siguientes: mb76, mb77, mb78, mb79, mb80, mb82, mb83, mb84, mb85 y mb86.

La purificación se realizó siguiendo las instrucciones de QIAquick PCR Purification Kit.

Primero se pipeteó el volumen total del microtubo procedente de la PCR para cada muestra a un eppendorf y a este eppendorf se le añadieron 5 veces el volumen en buffer PB. Por ejemplo, si tenemos 64  $\mu\text{l}$  de producto de la PCR le añadimos 320  $\mu\text{l}$  de buffer PB. Al mezclarlo debe tener un color amarillento, lo que nos indica que el pH es el correcto.

A continuación, se traspasó todo el contenido del eppendorf a una DNeasy Mini spin column colocada encima de un tubo de colección de 2 ml y se centrifugó 1 minuto a 13.000 rpm. Una vez acabada la centrifugación, se descartó el volumen del tubo de colección y se volvió a colocar el mismo debajo la DNeasy Mini spin column. Se añadieron 750  $\mu\text{l}$  de buffer PE y se volvió a centrifugar 1 minuto a 13.000 rpm. Se repitió el proceso de descarte del volumen del tubo de colección y luego de volver a colocar la DNeasy Mini spin column en el tubo, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, pero sin haber añadido ningún reactivo.

Finalmente, se colocó la DNeasy Mini spin column encima de un eppendorf y se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de agua con mucho cuidado en el centro de la membrana. Se centrifugó una última vez en las mismas condiciones y ya se obtuvo el ADN purificado suspendido en 30  $\mu\text{l}$  de agua que se encontraran en el eppendorf que hemos colocado debajo la DNeasy Mini spin column.

Antes de enviar el ADN purificado de cada muestra a secuenciar se comprobó la concentración de cada una de ellas mediante el NanoDrop, se siguió exactamente el mismo protocolo descrito anteriormente.

## **Secuenciación**

Para la secuenciación se enviaron las 10 muestras anteriormente purificadas precintadas con parafilm a macrogen Spain, una empresa especializada en secuenciación que se encuentra en Madrid. Además, en el envío se añadieron dos eppendorfs con 30 µl de cada uno de los dos primers usados a una concentración 10 µM.

## **Análisis de las secuencias obtenidas**

Una vez recibidas las secuencias de las 10 muestras por e-mail, se empezó su análisis mediante una serie de programas específicos. En primer lugar, se descargó una secuencia del GenBank para *Oc. mariae* y una para *Oc. caspius*, ambas secuencias obtenidas del ADN mitocondrial cytochrome oxidase subunit I (COI).

Seguidamente se compararon las dos secuencias de *Oc. caspius* obtenidas con la del GenBank, descargada anteriormente, mediante el programa BioEdit. Se abrieron las tres secuencias y se alinean mediante la opción ClustalW Multiple Alignment. A continuación, se hizo exactamente lo mismo con la secuencia de *Oc. mariae* descargada y las 8 secuencias de muestras propias. Finalmente se compararon todas las secuencias entre si para observar conjuntamente ambas especies.

A continuación, se importaron a BioEdit las secuencias propias excepto mb80 y mb78, las dos secuencias del GenBank anteriores y una nueva secuencia del GenBank del ADN mitocondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) de *Aedes aegypti*, esta última funcionara como outgroup para realizar el árbol filogenético. Se alinearon las secuencias y se cortaron para que no quedaran posiciones vacías al final o el principio de estas secuencias. Una vez guardadas en formato fasta se introdujeron en Mega.

Se usó el software Mega para generar un árbol de neighbour joining, que compara diferencias entre secuencias y proporciona un árbol no polarizado (Saitou, 1987). Usando el modelo kimura de 2 parámetros de distancia genética y con el soporte del Bootstrap method con 1000 repeticiones. Se realizó el árbol y se guardó la imagen correspondiente.

## **6.Resultados**

### **Muestreo**

Como ya se ha comentado anteriormente se muestrearon larvas de culícidos de 3 acumulaciones de agua en la localización ya descrita. Una vez que estas fases larvarias se desarrollaron se obtuvieron un total de 72 culícidos adultos, una larva que no se desarrolló y pieles de muda.

De estos 72 culícidos solamente 4 eran *Oc mariae* y ninguno era *Oc. caspius*. Aunque cabía esperar un mayor número de *Oc. mariae* el muestreo sirvió para volver a confirmar la presencia de esta especie en la costa rocosa del sur de la isla.

### **Identificación morfológica de *Ochlerotatus mariae* y de *Ochlerotatus caspius*.**

De los 25 individuos de *Oc. mariae* examinados 8 eran machos y 17 hembras. El sexo era muy fácil de identificar, incluso sin lupa, solo había que observar si las antenas eran pilosas o plumosas. En todas las características morfológica que esta especie comparte juntamente con *Oc. caspius*, según el criterio de Becker *et al* (2003) en Mosquitoes and their control, no ha habido ningún caso en que no se observara alguna de ellas, por ese motivo el estudio se centró más en las características que permiten diferenciar ambas especies.

Como ya se ha comentado, *Oc. mariae* se diferencia de *Oc. caspius* porque en el abdomen no hay una línea pálida central longitudinal, por lo tanto, esta fue la característica en la que más se centró el estudio.

De los 25 individuos no se observó ningún caso en que hubiera la línea pálida central longitudinal, por lo tanto, todos cumplían con el criterio establecido, hay que destacar que en bastantes casos la pérdida de escamas puede provocar confusiones y errores, ya que esto provoca que se difuminen las formas en el abdomen y que se puedan confundir. Por este motivo se recomienda solo realizar la identificación de individuos en buen estado de conservación, para evitar errores de este tipo.



**Figura 13:** Fotografías de Pere Antoni Forteza (UIB. 2016) Imágenes de *Oc. mariae* realizadas con la cámara incorporada a la lupa.

En las imágenes se observan 4 ejemplos diferentes de las formas que puede tener la coloración del abdomen, pero en todos se ve claramente que no hay ninguna línea pálida longitudinal.

A continuación, se exponen los resultados para *Oc. caspius*. De los 25 individuos observados 6 eran machos y 19 hembras. Igual que anteriormente, no se observaron diferencias morfológicas en cuanto a las características que esta especie comparte con *Oc. mariae*, por ese motivo nos centramos en las características que permiten diferenciar ambas especies.

Como ya se ha comentado, *Oc. caspius* se diferencia porque en el abdomen hay una línea pálida central longitudinal y en algunos casos el último segmento del abdomen se encuentra recubierto entero por escamas pálidas. A esta característica hay que añadir las siguientes: escutelo coloreado con dos estrechas franjas blancas dorsocentrales, que alcanzan el margen posterior y venas de las alas con escamas oscuras y pálidas más o menos uniformemente mezcladas.

En todos los individuos observados se ha visto la línea pálida longitudinal en el abdomen, más o menos intensa dependiendo de la cantidad de escamas que hubieran perdido. Sin embargo, en pocos casos se ha observado el último segmento recubierto enteramente por escamas pálidas, aunque cabe comentar que esta característica también depende de la conservación y de la posible pérdida de estas.



**Figura 14:** Fotografías de Pere Antoni Forteza (UIB. 2016). Imágenes de *Oc. caspius* realizadas con la cámara incorporada a la lupa.

En las imágenes se puede observar 4 casos en que la línea pálida se observa con más o menos claridad, vemos como en la primera fotografía esta se ve más difuminada por la pérdida de escamas y como por ejemplo en la última fotografía se observa bastante más claramente. Como se ha comentado hay pocos casos en que el último segmento este completamente cubierto con escamas pálidas, pero en la mayoría se casos si que se encuentra parcialmente recubierto.

Las dos líneas blancas dorsocentrales del escutelo se observaron más claramente igual que las escamas pálidas y negras mezcladas en las venas de las alas.



**Figura 15:** Fotografías de Pere Antoni Forteza (UIB. 2016). Imágenes de *Oc. caspius* realizadas con la cámara incorporada a la lupa.

En las imágenes se observan dos ejemplos del escutelo con las dos líneas blancas y un ejemplo de un ala con las escamas pálidas y negras en las venas.

En resumen, no se han observado casos en que los individuos no presenten las características típicas de cada especie, pero si se han observado casos en que estas características no se observan claramente debido a la pérdida de escamas que sufren los individuos o la mala conservación de estos.

### **Extracción ADN / Cuantificación mediante NanoDrop**

Como ya se ha comentado al finalizar la extracción de ADN se llevó a cabo una cuantificación del ADN extraído mediante el NanoDrop, estos son los resultados para las 14 muestras:

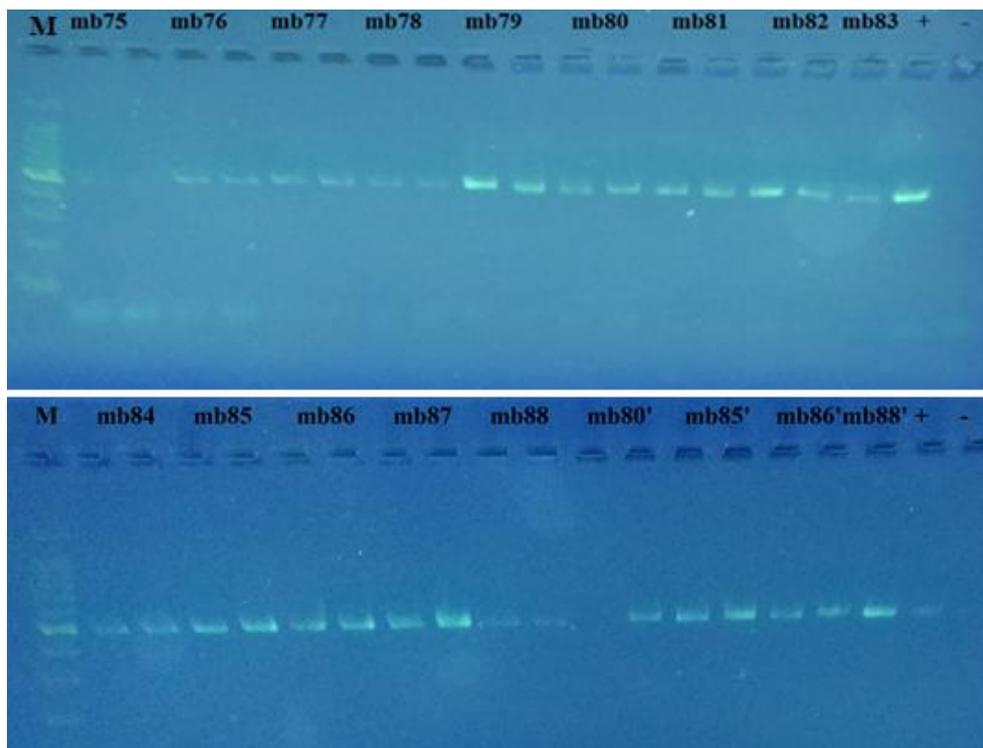
<b>Muestra</b>	<b>ng ADN/ <math>\mu</math>l</b>	<b>Muestra</b>	<b>ng ADN/ <math>\mu</math>l</b>
Mb75	24,3	Mb82	20,7
Mb76	20,0	Mb83	14,3
Mb77	29,9	Mb84	31,5
Mb78	17,8	Mb85	186,7
Mb79	92,5	Mb86	140,9
Mb80	100,1	Mb87	80,1
Mb81	21,7	Mb88	229,6

**Tabla 2:** Se observan los resultados de la cuantificación de ng ADN/  $\mu$ l tomados para las 14 muestras al finalizar la extracción de ADN. Estos resultados se obtuvieron con el NanoDrop.

Se observa como hay bastante variación en la cantidad de ADN extraído, llegando hasta los 229 ng ADN/  $\mu$ l en la muestra Mb81 y siendo el mínimo 14,3 ng ADN/  $\mu$ l en la muestra Mb83. El blanco dio un resultado de 0 ng ADN/  $\mu$ l por lo tanto se confirmó que la extracción había funcionado, por lo tanto, se podía continuar con el siguiente paso, la amplificación.

### **Amplificación mediante PCR del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I / Electroforesis en gel de agarosa**

Una vez llevada a cabo la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa para comprobar el tamaño de los segmentos de ADN que se habían amplificado. Se realizaron dos geles porque no cabían todas las muestras en uno y para cada uno de ellos se añadió un control positivo, uno negativo y un marcador. Además, cada muestra se encontraba por duplicado, ya que para una mayor veracidad se duplicaron las muestras antes de la amplificación. Comentar también que las muestras mb80', mb85', mb86' y mb88' son diluciones 1/6 echas después de la extracción de ADN ya que estas muestras presentaban valores de ng ADN/  $\mu$ l muy altos y se diluyeron para ver si había diferencias entre las diluciones y las muestras normales.



**Figura 16:** Fotografías de Pere Antoni Forteza (UIB. 2016). Imágenes de los resultados de los dos geles realizados. Ambas imágenes se tomaron con el gel encima del lector de ultravioletas.

En el primer pocillo de ambos geles se observa el marcador (M), que ha corrido sin dificultades. A continuación, se encuentran las muestras por duplicado, excepto para mb83 y para mb83' en las que no se realizó ningún duplicado. Observamos como en mb75 no se observa ninguna banda, pero en todas las demás muestras si que se observan bandas, siendo más marcadas por ejemplo en mb79, mb81, mb87 o mb85 entre otros. Además, añadir que el control positivo presenta una banda marcada en ambos geles, aunque más marcada en el primero y el negativo no presenta ninguna banda en ambos. Todas las bandas corresponden con el tamaño aproximado de 500 pares de bases, ya que están a la misma altura que esta banda en el marcador del primer pocillo. Estos resultados demuestran que la amplificación ha funcionado correctamente para todas las muestras excepto para mb75, unos de los duplicados de mb80' y para mb88, ya que las bandas de este son muy difusas.

Además, se ha demostrado que diluir las muestras solo ha resultado efectivo para mb88', en los otros casos la amplificación ha funcionado sin problemas.

**Purificación/ Cuantificación mediante NanoDrop**

Al igual que al acabar la extracción de ADN, después de la purificación se realizó una cuantificación de las 10 muestras que se enviarían a secuenciar. Los resultados de esta cuantificación son los siguientes:

Muestra	ng ADN/ $\mu$ l	Muestra	ng ADN/ $\mu$ l
Mb76	133,0	Mb82	20,1
Mb77	130,9	Mb83	55,9

Mb78	113,1	Mb84	76,2
Mb79	126,1	Mb85	144,5
Mb80	21,3	Mb86	146,0

**Tabla 3:** Se observan los resultados de ng ADN/  $\mu$ l para las 10 muestras que se enviaron a secuenciar. Estos resultados son después de la purificación y fueron tomados con el NanoDrop.

Se observan valores de ng ADN/  $\mu$ l altos en la mayoría de las muestras, además se confirma que la purificación ha funcionado correctamente y que no debería haber ningún problema para que se realizara la secuenciación con éxito.

### **Análisis de las secuencias obtenidas**

#### **BioEdit**

##### **Comparación entre *Oc. caspius***

Observamos como la secuencia de *Oc. caspius* del GenBank tiene 594 pares de bases, la de mb85 tiene 532 y la de mb86 524. Al alinearlas mediante el ClustalW se observa como hay unos 400 pares de bases bien alineadas. Cuando la alineación empieza a ser correcta observamos que las tres muestras difieren en muy pocos casos, concretamente solo hay 12 posiciones en que las tres secuencias no tienen los mismos pares de bases. En 10 de estos las dos muestras propias tienen el mismo nucleótido, pero difieren del de la base de datos y en solo 2 casos una de las dos muestras difiere con el de la base de datos.

##### **Comparación entre *Oc. mariae***

Observamos como la secuencia del GenBank tiene 763 pares de bases, en cambio las propias tienen entre 500 y 530 pares de bases, excepto mb80 que tiene unos 780 pares de bases. Una vez alineadas mediante el ClustalW observamos como en este caso si hay bastantes variaciones entre las muestras propias, tanto las de Valencia como las de Mallorca y la descargada, por este motivo se analizaron por separado. Al ver los resultados de la secuenciación para mb80 se decidió eliminar esta muestra ya que los picos de detección del nucleótido son muy bajos y no ofrecen suficiente fiabilidad. Se tomó la misma decisión para mb78, ya que los picos también eran muy bajos y por lo tanto los datos no eran lo suficientemente fiables.

Entre las 2 muestras de Valencia (mb76, mb77) las diferencias son prácticamente inexistentes, habiendo solo un par de posiciones en que no coinciden, concretamente en 4 posiciones desde que el alineamiento es correcto. Por este motivo se demuestra que la variación entre las muestras de Valencia es baja.

Entre las 4 muestras de Mallorca (mb79, mb81, mb82, mb83, mb84) la variación es mayor que entre las de Valencia. Se observa como al eliminar mb80 entre los cuatro restantes hay apenas 7 posiciones en que no coinciden. Llama la atención que en dos de los casos coinciden las muestras de s'Estanyol entre si, pero difieren con las de Betlem, que también coinciden entre si. En los otros casos solo se trata de alguna de las 4 secuencias que difiere de las demás.

Una vez comparadas las muestras de Valencia y Mallorca por separado las unimos en un único alineamiento. En este caso se observa que la variación también es baja, pero con algunos aspectos importantes, hay unas 10 posiciones en que las secuencias de Valencia difieren de las de Mallorca, es decir, las 2 muestras de Valencia tienen el mismo nucleótido y las 4 de Mallorca tienen uno diferente pero igual entre ellas. Esto demuestra que hay variación entre las poblaciones de Mallorca y la de Valencia.

Además, hay un caso en que las dos secuencias de Betlem difieren de todas las demás y otro caso en que las dos secuencias de s'Estanyol difieren de todas las demás. Los otros casos no siguen ningún patrón y se justifican como simples mutaciones de alguno de los individuos.

En este punto cabe destacar que el hecho más destacable es que haya tanta variación entre las poblaciones de Mallorca y la de Valencia. Sin embargo, las similitudes de la mayoría de secuencias con la que se ha descargado del GenBank son bastante menores de lo que cabría esperar.

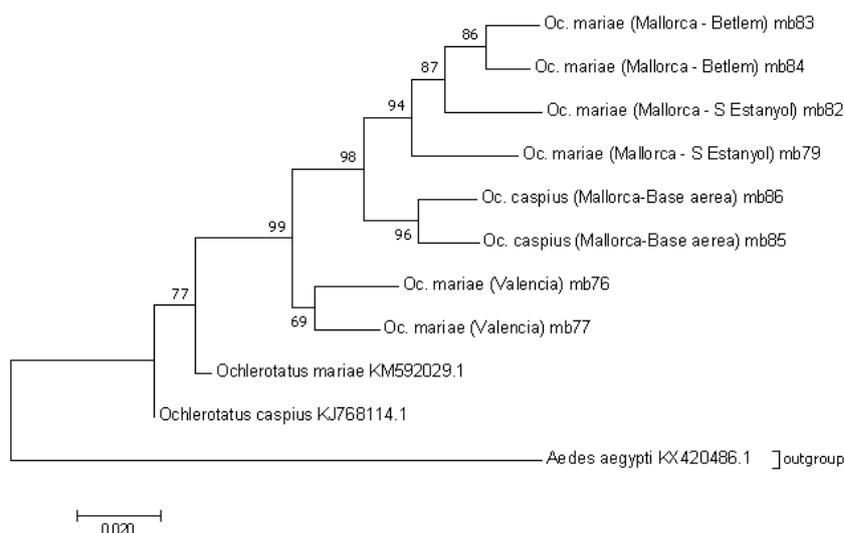
### Comparación entre *Oc. caspius* y *Oc. mariae*

Una vez observada la variación entre las poblaciones de Mallorca y las de Valencia y para intentar averiguar a que se debe vamos a comparar las dos muestras de *Oc. caspius* de Mallorca junto con los *Oc. mariae* de Mallorca y las de Valencia.

Al tratarse de especies tan cercanas las similitudes son bastante altas, pero hay algunos casos que llaman bastante la atención, en 3 posiciones las 4 muestras de *Oc. mariae* de Mallorca difieren tanto de las de Valencia como de las de *Oc. caspius*, pero sin duda lo más destacable es que en 5 posiciones los *Oc. mariae* de Mallorca coinciden todos con los *Oc. caspius* pero no con los *Oc. mariae* de Valencia. Es decir, las dos especies de Mallorca tienen los mismos nucleótidos y estos no coinciden con los de *Oc. mariae* de Valencia. Esta podría ser la prueba de que se está produciendo una hibridación entre las dos poblaciones de especies diferentes en Mallorca.

### MEGA

El árbol basado en el neighbor joining que se obtuvo fue el siguiente:



**Figura 17:** Imagen extraída del programa Mega en la que se observa el resultado del árbol filogenético realizado entre las muestras propias, las del GenBank, y usando *Aedes aegypti* como outgroup.

Los valores que se observan corresponden con el porcentaje de veces de las 1000 repeticiones en que esta fue la forma del árbol. Estos valores deben ser mayores al 70% para que sean válidos estadísticamente.

Observamos como los *Oc. mariae* mb83 y mb84 de Betlem son los más alejados de los demás, seguidos de mb82 y mb79, que son los individuos de S'Estanyol. Los 4 individuos de Mallorca forman así una ramificación lógica. A continuación, vemos que los dos individuos de *Oc. caspius* mb86 y mb85 se encuentran más cercanos a los *Oc. mariae* de Mallorca que a la secuencia del GenBank, incluso se encuentran más cercanos que los *Oc. mariae* de Valencia. Esto podría respaldar la comentada hibridación entre ambas especies, ya que es sorprendente que estas dos especies sean más cercanas entre si que los *Oc. mariae* de las diferentes poblaciones de Mallorca y Valencia.

Finalmente se observa como los *Oc. mariae* de Valencia son los más parecidos a las secuencias del GenBank y llama la atención también que incluso sean más similares a la secuencia de *Oc. caspius* del GenBank que los *Oc. caspius* de Mallorca. Estos resultados son bastante sorprendentes y todos tienen una validez estadística suficiente, esto demuestra que es posible que se este produciendo la comentada hibridación entre ambas especies en Mallorca.

## 7. Discusión

Este estudio se puede separar en dos ramas bien diferenciadas, por una parte, se quería llevar a cabo una identificación morfológica de ambas especies y a continuación sustentar estos resultados en las pruebas genéticas pertinentes, tratando así de dar una validez mayor a los resultados obtenidos.

Debido a la reciente confirmación de la presencia de *Ochlerotatus mariae* en la costa de Mallorca (Bueno & Jiménez, 2011) era importante volver a muestrearla y demostrar que se encuentra totalmente establecida. Una vez confirmada su presencia y teniendo en cuenta su papel como vector de parásitos tan importantes como *Plasmodium relictum* (Gutsevich *et al.*, 1974), se hace de imperiosa necesidad incluir las zonas rocosas costeras a los inventarios y catálogos que manejan los municipios para diseñar las estrategias de vigilancia de puntos críticos de mosquitos en sus ámbitos de actuación (Bueno & Serna, 2015). Se ha demostrado que la mejor estrategia frente a las especies exóticas invasoras, como es el caso de *Plasmodium relictum*, es la prevención antes de que se den los primeros casos, por ese motivo es importante la inclusión de esta especie en los programas de control.

En el apartado morfológico se han identificado veinte cinco individuos de cada especie sin reportar ningún caso en que las características morfológicas no fueran las esperadas. Por lo tanto, no se han encontrado evidencias que demuestren la supuesta confusión morfológica entre ambas especies, ya que los únicos casos en que se pueden cometer errores es cuando las muestras no se encuentran en buen estado. Cuando esto ocurre lo mejor es descartar a los individuos, ya que no se pueden obtener resultados validos de muestras deterioradas. Como se ha comentado antes, las diferencias morfológicas entre ambas especies existen, aunque sean mínimas (Becker *et al.*, 2003).

Sin embargo, se debería aumentar el alcance de este estudio, ya que al reducir los individuos identificados a solo dos localizaciones se limitan mucho los resultados. Para confirmar que ambas especies no presentan características diferentes a las ya descritas por Becker *et al* (2003), se debería realizar un muestreo a mayor escala en diversos puntos de la isla y con un número de individuos mucho mayor.

Tal como se ha explicado se llevó a cabo un análisis genético, en este punto cabe destacar que era muy importante obtener muestras de *Oc. mariae* de otras poblaciones para poder realizar una comparativa, ya que el reciente descubrimiento de esta especie en Mallorca alberga numerosas dudas sobre si es una especie autóctona que no se había detectado o por si lo contrario ha llegado recientemente.

La extracción del material genético tal como demuestran los resultados de la cuantificación posterior fue exitosa, por lo que se confirma que el protocolo seguido es adecuado para culícidos. La concentración en esta cuantificación difiere bastante entre muestras, pero se confirma que esto no afecta en principio a la amplificación del gen mitocondrial citocromo C oxidasa I. En la electroforesis se han observado bandas bien claras tanto en muestras con una elevada concentración como puede ser mb85 o mb86 como también en las diluciones 1/6 de estas mismas muestras.

Cabe destacar que las bandas han sido mucho más tenues en las muestras procedentes de Valencia, tal vez debido al transporte de las muestras hasta Mallorca o el hecho de que se encontraran resuspendidas en etanol, mientras que todas las demás estuvieron en eppendorfs en el congelador sin añadir ninguna sustancia. Solo las muestras mb75 y mb88 no se han amplificado, tal vez debido a algún error humano durante el protocolo o un mal acoplamiento durante la amplificación. Se confirma que en su mayoría la amplificación fue exitosa, y que los primers usados son los adecuados para estas especies.

Los resultados de la cuantificación posterior a la purificación también confirman que había material genético para la secuenciación, por lo que los resultados poco significativos obtenidos de las secuencias de las muestras mb82 y mb79 seguramente sean debido a algún problema durante la secuenciación llevada a cabo por MacroGen.

Al recibir las secuencias y hacer su posterior análisis surgieron algunos aspectos que deben ser comentados, en primer lugar, la diferencia entre las secuencias obtenidas y las secuencias descargadas de la base de datos, en especial en *Oc. mariae*, esto ensombrece los resultados que comentaremos a continuación. No se puede esclarecer si realmente estas secuencias difieren tanto de las de la base de datos o si esta diferencia se debe a errores durante la secuenciación de las muestras enviadas.

Sin embargo, si debemos destacar que la variación entre las muestras de una misma población siempre es menor que entre estas muestras y las descargadas, por ejemplo, al comparar las muestras de *Oc. mariae* de Mallorca entre si, vemos que hay menos diferencias que entre estas muestras y la de la base de datos. Aunque no con rotundidad, esto podría demostrar que realmente no ha habido errores en la secuenciación, ya que sería poco probable que se hubieran producido los mismos errores en las mismas posiciones en todas las secuencias de los individuos de una misma población. Es posible que realmente exista tal variación entre la población de Mallorca, la de Valencia y la de la base de datos.

Finalmente, el resultado más sorprendente corresponde a la ya comentada posible hibridación entre *Oc. mariae* y *Oc. caspius* en Mallorca, aunque los datos aun no son suficientes para afirmarlo con rotundidad, si que se plantea esta posibilidad. Aunque esta hibridación aun no

habría presentado evidencias morfológicas, porque como se ha comentado antes, no se han observado individuos que no cumplan con las características morfológicas esperadas. Hay que destacar que otros estudios han demostrado hibridación entre *Oc. mariae*, *Oc. zammitii* (Cianchi et al, 1978), y *Oc. phonicciae*, las tres especies del complejo *mariae*.

Como se ha comentado antes, el árbol filogenético realizado se debe tener en cuenta a la hora de analizar esta posibilidad, se puede deducir que *Oc. mariae* de Mallorca y *Oc. caspius* son más cercanos de lo que se esperaba e incluso son más cercanos entre si que las dos poblaciones de *Oc. mariae* estudiadas (Valencia y Mallorca).

A pesar de no haber esclarecido totalmente la relación entre ambas especies en la isla de Mallorca, los resultados obtenidos nos obligan a seguir estudiando e investigando en este aspecto, ya que la posibilidad de una hibridación entre ambas especies no es una afirmación descabellada, por lo que sería muy interesante intentar realizar dicha hibridación en el laboratorio en un futuro próximo.

## 8. Conclusiones

- Tanto *Ochlerotatus caspius* como *Ochlerotatus mariae* son vectores de enfermedades y podrían actuar como tal en un futuro próximo con la llegada de los agentes infecciosos. Esta preocupación es un tema de total actualidad en Europa debido a la cada vez más creciente inmigración. Ambas especies están confirmadas en Mallorca.

- No se han observado características morfológicas tanto en *Ochlerotatus mariae* como en *Ochlerotatus caspius* que no correspondan con las esperadas.

- La secuenciación del gen citocromo C oxidasa I de varias muestras de ambas especies, incluidos algunos ejemplares de otra población, concretamente de Valencia, ha funcionado correctamente y se han obtenido secuencias para su comparación.

- El análisis y comparación de dichas secuencias no ha dejado resultados definitivos, pero si ha abierto la posibilidad de que haya una diferencia genética importante entre las poblaciones de *Ochlerotatus mariae* de Mallorca y la de Valencia.

- Esta diferencia genética puede ser provocada por una posible hibridación entre ambas especies en Mallorca.

- Hay que seguir investigando en el futuro sobre esta posible hibridación, ya que este estudio no ha sido suficiente para demostrarla, pero si ha conseguido crear dudas que deben ser resueltas al respecto.

## 9. Bibliografía

- Arias, J. (1912). Datos para el conocimiento de la distribución de los Dípteros de España. *Real Sociedad Española de Historia Natural*, **7**: 61-246
- Atkinson, C., Woods, L., Dusek, J., Sileo, S., & Iko, W. (1995). Wildlife disease and conservation in Hawaii: pathogenicity of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally infected iiwi (*Vestiaria coccinea*). *Parasitology* **111**(Suppl.): S59–S69.
- Atkinson, C., Dusek, J., Woods, L., & Iko, W. (2000). Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* **36**(2):197-204.
- Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P., & Bicout, D. (2006). Horse-, Bird-, and Human-Seeking Behavior and Seasonal Abundance of Mosquitoes in a West Nile Virus Focus of Southern France. *Journal Of Medical Entomology*, **43**(5): 936-946.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2003) *Mosquitoes and their Control*. Ed. Springer. 577 pp.
- Bennett, S., Gresko, K., Murphy R., & Whitehead, S. (2011). Tahyna virus genetics, infectivity, and immunogenicity in mice and monkeys. *Virology Journal*. **8**: 135.
- Bueno, R., & Jiménez, R. (2011). First confirmed record of *Ochlerotatus mariaae* (Sergent & Sergent, 1903) in the Balearic Islands (Spain) and its significance in local mosquito control programmes. *European Mosquito Bulletin* **29**, 82-87.
- Bueno, R., & Serna, P., (2015). Primera cita de *Ochlerotatus mariaae* (Sergent & Sergent, 1903) (Diptera, Culicidae) en la Comunidad Valenciana: Implicaciones en el control de esta especie singular. *Revista gaditana de Entomología*, **6**: 63-66.
- Borror, D. J., DeLong, D. M., & Triplehorn, A. (1976). *An introduction to the study of insects*. Holt, Rinehart and Winston. New York, Chicago. ISBN 0-03-088406-3.
- Clavero, G. (1946) Aedinos de España. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* **20**, 1205-1232.
- Coluzzi, M., Bullini, L., Bianchi, A. (1971). Phosphoglucosmutase polymorphism in *Aedes phoeniciae* Coluzzi & Sabatini of the *Ae. mariaae* complex (Dipt., Culicidae). *Bulletin Of Entomological Research*, **61**(02), 327.
- Cianchi, R., Urbanelli, S., Bullini, L. (1978) Genetic distance between two sibling species of the *Aedes mariaae* complex (Diptera, Culicidae). *Parassitologia* **20**(1-3): 39-76.
- Cywinska, A., Hunter, F., Herbert, P. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical And Veterinary Entomology*, **20**(4):413-424.

Encinas, A. (1982) Taxonomía y biología de los mosquitos del área salmantina (Diptera, Culicidae). Doctoral Thesis. Universidad de Salamanca. 437 pp.

Eritja, R., Aranda, C., Padrós, J., Goula, M., Lucientes, J., Escosa, R., Marquès, E. & Cáceres, F. (2000) An annotated checklist and bibliography of the mosquitoes of Spain (Diptera: Culicidae). *European Mosquito Bulletin* **8**, :10-18.

Sánchez, A., Sierra, M., Santos, S., Suárez, B., Simón, & F., Amela, C. (2014) Evaluación del Riesgo para España de la Fiebre del Valle del Rift. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES). Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Gad, A., Farid H., Ramzy, R., Riad, B., Presley, M., & Cope, E. (1999) Host feeding of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with the recurrence of Rift Valley fever in Egypt. *J. Med. Entomol.* **36**(6): 709–14.

Gil, J. (1932) Datos entomológicos. In: *Memorias de la Comisión Central Antipalúdica* :322-337.

Gil, J. (1935) Quelques considérations sur les gîtes larvaires des Culicidés espagnols. *Comptes Rendus du XII Congrès International de Zoologie*, Lisbonne **3**: 2065-2078.

Gutsevich, A.V., Monchadskii, A.S., & Shtakelberg, A.A. (1974) Fauna of the U.S.S.R. Diptera, Mosquitoes, Family Culicidae. *Academy of Sciences of the USSR, Zoological Institute, Leningrad*. No. **100**, Vol. 3. 384 pp. English translation: Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem. (Original in Russian published in 1971).

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., & deWaard, J. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*, **270**(1512) : 313-321.

I. Olaizola. (2010). El mosquito 'oportunist' causa estragos , de Diario de Mallorca Sitio web: <http://www.diariodemallorca.es/mallorca/2010/05/22/mosquito-oportunist-causa-estragos/572410.html>.

Hubálek Z., Halouzka J. (1999) West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*, **5**(5):643-50.

Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. Volume **4** :406–425,

Savage, M., Strickman, D. (2004) The genus and subgenus categories within Culicidae and placement of Ochlerotatus as a subgenus of Aedes. *J Am Mosq Control Assoc.* **20**(2): 208-14.

Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000). 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. *Una selección del Global Invasive Species Database*, Aliens 12.

Margalef, R. (1949) Sobre la ecología de las larvas del mosquito *Aedes mariae*. Instituto de Biología Aplicada **6**, 83-102.

Nájera, L. (1943) Los Aedinos españoles y el peligro de la Fiebre Amarilla. *Graellsia* **1**, 29-35.

Organización Mundial de la Salud. Fiebre del Valle del Rift. Nota descriptiva No 207. [Internet]. [cited 2013 Jul 4]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/es/>

Padial, J., De la Riva I., (2007) Integrative Taxonomists Should Use and Produce DNA Barcodes. *Syst Biol.* **1586**: 67-68.

Cranston, P., Ramsdale C., Snow K., White G. (1987). Adults, larvae and pupae of British mosquitoes (Culicidae): a key continued 48. *Freshwater Biological Association.* **48**:152.

Melero, R., Molina, R., Miranda M., Rincón C. (2006) Aportación al conocimiento de la fauna de culícidos (Diptera: Culicidae) de las Islas Baleares II: islas de Mallorca y Formentera. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, **38** : 333–334.

Reinert, J., Harbach, R., Kitching, I. (2004). Phylogeny and classification of Aedini (Diptera: Culicidae), based on morphological characters of all life stages. *Zoological Journal Of The Linnean Society*, **142**(3), 289-368.

Reinert, J. (2001). Revised list of abbreviations for genera and subgenera of Culicidae (Diptera) and notes on generic and subgeneric changes. *Journal of the American Mosquito Control Association* **17**(1): 51-55.

Senevet, G., Anderelli, L. (1964). Les moustiques de L´Afrique du Nord et du bassin Méditerranéen. III.- Les Aedes. Deuxieme partie. Sous-genre Ochlerotatus groupe H. *Arch. Inst. Pasteur d´Algerie*, **44**, 51-74.

Sissoko, D., Giry C., Gabrie P., Tarantola A., Pettinelli F., Collet L. (2009). Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008. *Emerging Infect. Dis.* **15**:568–70.

Stone, A., Knight K., Starke H. (1959). A Synoptic catalog of the mosquitoes of the world. (Diptera: Culicidae). 2nd ed. *The Thomas Say Foundation* **6**. 358pp.

Cañamares, F. (1979) Breve relación crítica de los mosquitos españoles. *Revista de Sanidad e Higiene Pública* **53**, 985-1002.

Turell, M., Presley, M., Ture, M., Cope, E., Dohm, J., & Morrill C. (1996). Vector competence of Egyptian mosquitoes for Rift Valley fever virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **54**(2):136–9.

USDI y USGS (2005) .U.S. Department of the Interior (USDI) and U.S. Geological Survey (USGS).

Van Riper, S. (1991). The impact of introduced vectors and avian malaria on insular passeriform bird populations in Hawaii. *Bulletin of the Society of Vector Ecologists* **16**: 59–83.

Van Riper, S., Goff, L., & Laird, M. (1982). The impact of malaria on birds in Hawai'i Volcanoes National Park. *Cooperative National Park Resources Studies Unit Technical Report*, **47**.

Warner, E., (1968). The role of introduced diseases in the extinction of the endemic Hawaiian avifauna. *Condor* **70**: 101–20.

Wiegman, B., & Yeates, D. (2012). *The Evolutionary Biology of Flies*. Columbia University Press. pp. 4-6.

World Health Organization. Rift Valley fever, South Africa. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2014 May 14;85(20):177–8.

Wyatt, N., & Cheng, L. (2015). *Aedes (Ochlerotatus) mariaae* (Sergent & Sergent, 1903). Accessed through: World Register of Marine Species.