

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



**Registros de mosquitos xv: las mosquitas picadoras de ranas (Diptera:
Corethrellidae) de la colección de mosquitos del Departamento de
Parasitología de la UAAAN-UL**

POR

NOELINDA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

TORREÓN, COAHUILA

MAYO DE 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Registros de mosquitos xv: las mosquitas picadoras de ranas (Diptera:
Corethrellidae) de la colección de mosquitos del Departamento de
Parasitología de la UAAAN-UL

POR

NOELINDA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

TESIS QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

APROBADA POR:

PRESIDENTE:


Dr. Aldo Iván Ortega Morales

VOCAL:


Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos

VOCAL :


Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga

VOCAL SUPLENTE:


Dr. Luis Miguel Hernández Triana


M.E. Víctor Martínez Cueto

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA

MAYO DE 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Registros de mosquitos xv: las mosquitas picadoras de ranas (Diptera:
Corethrellidae) de la colección de mosquitos del Departamento de
Parasitología de la UAAAN-UL

POR:

NOELINDA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

TESIS

QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORIA COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO

APROBADA POR

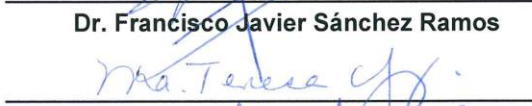
ASESOR PRINCIPAL:


Dr. Aldo Iván Ortega Morales

ASESOR:


Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos

ASESOR:


Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgasga

ASESOR:


Dr. Luis Miguel Hernández Triana


M.E. Víctor Martínez Cueto

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA

MAYO DE 2018



AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, agradecida eternamente con Dios por darme la vida y la salud, por el apoyo y por haberme dado las armas necesarias para seguir adelante, la capacidad de poder estudiar y la sabiduría para entender las cosas difíciles. Sin tu ayuda y la fe que tengo en ti no lo hubiera logrado. Gracias señor por haber estado a mi lado y cuidar de mi familia y por tantas bendiciones que han llegado a mi vida, terminar la carrera. Por no dejarme sola a pesar de las dificultades que me han pasado, gracias mi señor por cuidar de mí en los peores momentos de mi vida, por darme la oportunidad de estudiar en la UAAAN-UL y poder hacer realidad mi sueño al lado de mis compañeros, maestros y amigos.

A mi “**Alma Terra Mater**” Por darme la oportunidad de estudiar dentro de sus aulas, por su gran enseñanza en mi vida de universitaria y por brindarme lo necesario, lo cual jamás olvidaré, a donde quiera que vaya te llevaré siempre en alto.

Al **Dr. Aldo I. Ortega Morales**, gracias doctor por ser mi asesor principal, por instruirme y darme la oportunidad de formar parte de este gran proyecto de investigación, por su disposición a toda hora y la ayuda que me aportó como profesor, asesor y amigo. Mil gracias por la paciencia, amabilidad, tiempo y dedicación que tuvo conmigo. Fue un honor para mí trabajar con usted.

Al **Dr. Luis Miguel Hernández Triana**, muchas gracias doctor por la gran ayuda que me aportó como asesor externo, mil gracias por el tiempo, paciencia y dedicación que tuvo conmigo. Agradeciendo la importante contribución para obtener

los resultados de este trabajo y por darme la oportunidad de formar parte de su aprendizaje. Fue un honor trabajar este proyecto con usted.

A mis **Asesores de Tesis**, Dr. Francisco Javier Sánchez Ramos, Dra. Ma. Teresa Valdés Perezgagsa, y al Dr. Javier Alfonso Garza Hernández, por su tiempo y dedicación y por todas sus gratas atenciones en la revisión de este trabajo de investigación.

A mis maestros, en especial a la maestra **Sonia López Galindo**, quien es una gran maestra y una gran persona, a la cual admiro y quien me otorgó buenos consejos que me ayudaron en mi carrera profesional, gracias por su tiempo, sus atenciones y también le agradezco porque durante la carrera profesional, fue una gran amiga con quien podía platicar, muchas gracias maestra, Dios le bendiga siempre.

A la **Ing. Bertha Alicia Cisneros Flores**, por ser una de las mejores maestras de mi carrera. Gracias por todas sus enseñanzas, dedicación y por su insistencia en forjar verdaderos Ingenieros Agrónomos Parasitólogos, porque siempre se preocupó por darnos un buen aprendizaje y gracias a ello me ayudó a ser la persona que ahora soy, gracias maestra por sus consejos y por compartir sus buenos conocimientos.

Mis sinceros agradecimientos **a todo el personal académico del Departamento de Parasitología**, por todas sus atenciones brindadas, por compartir sus conocimientos y por darme las herramientas necesarias para desempeñarme en el ámbito profesional.

A la **Red temática SEP-CONACyT de Códigos de Barras de la Vida** (MEXBOL) por financiar algunas de las expediciones para la colecta de Corethrellidae en el estado de Tabasco (CUAC1414-C).

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Florentino Hernández Roblero y Ademia González Pérez, por darme la vida y enseñarme a vivirla. Gracias por enseñarme que en la vida todo tiene un costo y que se requiere de mucho esfuerzo para realizar y lograr mis metas, ellos me enseñaron a ganar lo que tengo. Mil y millones de gracias por creer y confiar en mí, por darme la oportunidad de estudiar, por ser mi gran fortaleza y guía a seguir, por apoyarme en las buenas y en las malas, por sus preocupaciones por mi bienestar y por crear en mí la ilusión de cumplir mis metas y tener una profesión. Es un orgullo y honor tenerlos como padres porque me enseñaron que en la vida no hay que rendirse, porque con esfuerzo y dedicación todo se puede, los amo y siempre los llevo en mi mente y en mi corazón.

A mis hermanos:

Eufelio Hernández González, Arnulfo Hernández González, Pablo Rigoberto Hernández González, Benaías Hernández González y Ezequiel Hernández González, por su inmenso apoyo incondicional que mostraron durante la realización de mi carrera profesional, por los consejos que siempre me dieron y por tener las esperanzas en mí. Me siento orgullosa de tener unos hermanos como ustedes, los quiero mucho.

A mi hermana:

Carmi Leticia Hernández González, por su apoyo incondicional y gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, por compartir tristezas y alegrías, por

tus consejos y la confianza que depositaste en mí durante la carrera profesional, te quiero mucho y espero que juntas celebremos nuestros logros.

A mis abuelos:

Sr. Élfego González López y Sra. Adelina Pérez Vázquez. Por su apoyo, cariño y consejos que me han brindado durante el trayecto de mi vida y en la etapa de mi carrera profesional y por confiar en mí en todo momento, los amo abuelitos, Dios los bendiga.

A mis madrinas

Arquitecta Carmen Moreno Castañón, Profesora Roxana Velázquez Arrasáte, Deyanira Dardon Arrasáte. Por su apoyo, sus consejos y por su gran cariño que me han brindado, a pesar de la distancia siempre me estuvieron dando palabras de aliento durante mi carrera profesional, gracias maestras por estar conmigo siempre y por sus grandes enseñanzas, las quiero mucho, Dios los bendiga.

A mis mejores amigas y amigos:

Martha Gereni Domínguez Morales, Albi Liliana Mejía Velázquez, Yesica Dalila Sifuentes, Reyna Isabel De León Bravo, Doyma Morales Morales, Edna Yolanda Arellanes Ávila, Tanaita Nicté-ha Argaes Hernández, Silustria Lara Hernández, Rosalía López Asunción, Bilgai Morales Morales, Geyber Roblero, Gandhi Joao Escalante Pérez, Yoner Joachin Ortiz, José Valente Joachin y Julio Mundo Brito. Por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por hacerme reír en los momentos tristes, por su apoyo y todos esos ánimos que me brindaron siempre que los necesité. Dios me los bendiga siempre, los quiero y los extraño mucho amigos.

RESUMEN

Las mosquitas picadoras de ranas (Diptera: Corethrellidae) pertenecen a una familia monobásica que incluye al género *Corethrella*. En el mundo se conocen 107 especies las cuales en su mayoría se distribuyen en las regiones tropicales. Las hembras se sienten atraídas por el llamado de canto de ranas macho (de allí su nombre) y se alimentan de su sangre para producir sus huevos. Algunas especies de *Corethrella* son vectores de *Trypanosoma* sp. a las ranas macho. En el presente trabajo se realizó un estudio taxonómico que involucra técnicas morfométricas y moleculares para la identificación de las especies de mosquitas picadoras de ranas que se encuentran depositadas en la colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro unidad laguna. Las mosquitas picadoras de ranas fueron colectadas en los estados de San Luis Potosí y Tabasco utilizando trampas CDC con sonido de canto de ranas de diferentes especies emitidas por un dispositivo de sonido. Resultados: En San Luis Potosí se encontraron: *Corethrella appendiculata*, *Corethrella* sp. 1, *Corethrella* sp. 2, *Corethrella* n. sp. 1; Tabasco: *C. amazonica*, *C. appendiculata*, *C. aridicola*, *C. edwardsi*, *C. puella*, *C. quadrivittata*, *C. selvicola*, *C. squamifemora*, *Corethrella* sp. 3, *Corethrella* n. sp. 2, *Corethrella* n. sp. 3, *Corethrella* n. sp. 4. Se descubrieron nuevos registros estatales para Tabasco, los cuales son: *C. vittata*, *C. amazonica*, *C. aridicola*, *C. selvicola* y *C. squamifemora*. Además se obtuvieron nuevos registros nacionales, los cuales son: *C. edwardsi* y *C. vittata*. Tres especies no pudieron ser identificadas, mientras que cuatro especies resultaron ser nuevas para la ciencia. Finalmente, todos los Números Binarios de Identificación (BINS) resultaron ser nuevos.

Palabras claves: Corethrellidae, San Luis Potosí, Tabasco, nuevos registros, nuevas especies.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS	iv
RESUMEN.....	vi
INDICE.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general.....	6
1.2 Objetivos específicos.....	6
1.2 Hipótesis.....	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1 Familia Corethrellidae	7
2.2 Clasificación taxonómica.....	8
2.3 Distribución geográfica de la familia Corethrellidae	8
2.4 Biología de la familia Corethrellidae	10
2.4.1 Huevo.....	10
2.4.2 Larva	10
2.4.3 Pupa.....	11
2.4.4 Adulto	11
2.5 Importancia médica y veterinaria de la familia Corethrellidae.....	13
2.6 Taxonomía por medio de herramientas moleculares.....	14
2.7 La colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Descripción de las áreas de estudio	17
3.1.1 San Luis Potosí.....	17
3.1.2 Tabasco	18
3.2 Colecta de mosquitos picadoras de ranas	19
3.3 Metodología para la identificación taxonómica y molecular de las muestras.	21
3.3.1 Elaboración de las placas para código de barras de ADN.....	22

3.3.2 Extracción de ácidos nucleicos (ADN)	25
3.3.3 Secuenciación y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
3.3.4 Electroforesis en Gel de Agarosa	27
3.3.5 Alineación de secuencias genómicas	27
3.3.6 Elaboración de cladogramas de diversidad de distancias genéticas (NJ-Tree).....	28
3.3.7 Elaboración de cladogramas de inferencia filogenética.....	28
3.3.8 Obtención del Número Binario de Identificación (BIN)	29
3.4 Fijación y montaje de los especímenes.....	29
IV. RESULTADOS.....	33
Cuadro 1 Compendio taxonómico de las <i>Corethrella</i> de la colección CC-UL.....	jError!
Marcador no definido.	
4.1 <i>Corethrella amazonica</i> Lane.....	34
4.2 <i>Corethrella appendiculata</i> Grabham	35
4.3 <i>Corethrella aridicola</i> Borkent.....	37
4.4 <i>Corethrella edwardsi</i> Lane.....	38
4.5 <i>Corethrella puella</i> Shannon y Del Ponte.....	38
4.6 <i>Corethrella quadrivittata</i> Shannon y Del Ponte	40
4.7 <i>Corethrella squamifemora</i> Borkent.....	41
4.8 <i>Corethrella selvicola</i> Lane	42
4.9 <i>Corethrella vittata</i> Lane.....	43
4.10 <i>Corethrella</i> sp. 1.....	44
4.11 <i>Corethrella</i> sp. 2.....	45
4.12 <i>Corethrella</i> sp. 3.....	46
4.13 <i>Corethrella</i> n. sp. 1	47
4.14 <i>Corethrella</i> n. sp. 2	48
4.15 <i>Corethrella</i> n. sp. 3	49
4.16 <i>Corethrella</i> n. sp. 4	50
V. DISCUSIONES.....	53
VI. CONCLUSIONES	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62
ANEXO 1	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Compendio taxonómico de las <i>Corethrella</i> de la colección CC-UL.....	33
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de las especies de <i>Corethrella</i> en México.....	9
Figura 2 Larva de <i>Corethrellidae</i> A. Cuerpo completo B. Capsula cefálica (Borkent, 2012)	11
Figura 3 Venación de las alas de <i>Corethrella</i> (Borkent, 2012)	12
Figura 4 Adultos de <i>Corethrellidae</i> . Macho y hembra (Borkent, 2008)	13
Figura 5 Hembras adultas de <i>Corethrella</i> alimentándose de una rana macho (Bernal y Silva, 2015)	14
Figura 6 Estado de San Luis Potosí, México.....	18
Figura 7 Estado de Tabasco, México	19
Figura 8 Trampa de luz CDC con bocina que reproduce el sonido del canto de ranas .	20
Figura 9 Acomodo del material de <i>Corethrellidae</i> . A. Microscopio estereoscópico, B. Cédulas de colecta, C. Refrigerador donde el material se preservó, E. Revisión de bitácora, F-I. Viales con <i>Corethrella</i> provenientes de los estados de San Luis Potosí y Tabasco	22
Figura 10 Elaboración del llenado de las placas Eppendorff® para PCR.....	25
Figura 11 Montaje de los especímenes de <i>Corethrellidae</i>	32
Figura 12 Características distintivas de <i>C. amazonica</i>	35
Figura 13 Características distintivas de <i>C. appendiculata</i>	36
Figura 14 Características distintivas de <i>C. aridicola</i>	37
Figura 15 Características distintivas de <i>C. edwardsi</i>	38
Figura 16 Características distintivas de <i>C. puella</i>	39
Figura 17 Características distintivas de <i>C. quadrivittata</i>	40
Figura 18 Características distintivas de <i>C. squamifemora</i>	41
Figura 19 Características distintivas de <i>C. selvicola</i>	43
Figura 20 Características distintivas de <i>C. vittata</i>	44
Figura 21 Características distintiva de <i>C. sp.1</i>	44
Figura 22 Características distintivas de <i>C. sp. 2</i>	45
Figura 23 Características distintivas de <i>C. sp. 3</i>	46
Figura 24 Características distintivas de <i>C. n. sp. 1</i>	47
Figura 25 Características distintivas de <i>C. n. sp. 2</i>	48
Figura 26 Características distintivas de <i>C. n. sp. 3</i>	49
Figura 27. Figura 27 Características distintivas de <i>C. n. sp. 4</i>	50
Figura 28 Neighbor Joining de las especies de <i>Corethrella</i> , incluyendo el número binario de identificación para cada especie.....	51
Figura 29 Distribución de especies de <i>Corethrellidae</i> en el estado de San Luis Potosí, México.....	52
Figura 30 Distribución de especies de <i>Corethrellidae</i> en el estado de Tabasco, México	52

I. INTRODUCCIÓN

Las mosquitas picadoras de ranas (Diptera: Corethrellidae) son un grupo de Dípteros que taxonómicamente están muy cercanas a otros grupos como los mosquitos fantasma (Chaoboridae) y mosquitos (Culicidae) (Borkent, 2008). A nivel mundial, se conocen 107 especies vivientes y 7 fósiles (Amaral y Pinho, 2015). Todas las especies de esta familia se encuentran en el género *Corethrella* Coquillett (Gil-Azevedo *et al.*, 2016). Los miembros de la familia Corethrellidae se conocen como “mosquitas picadoras de ranas” porque las hembras de la mayoría de las especies son atraídas por el canto de las ranas macho para alimentarse de su sangre y de este modo sintetizar proteínas esenciales para el desarrollo de sus huevos (de Silva y Bernal, 2013). Debido a este modo de alimentación, algunas especies actúan como vectores del parásito *Trypanosoma* sp que es el agente causal de la tripanosomiasis en ranas macho (Borkent, 2008).

Durante muchos años la familia Corethrellidae fue muy poco estudiada, conociéndose solo 64 especies y representadas por una cantidad pequeña de especímenes recolectados incidentalmente en muy pocos sitios. La mayoría de las colecciones entomológicas incluían menos de 20 especímenes (Borkent, 2008). Actualmente las hembras de *Corethrella* pueden ser colectadas en grandes números empleando trampas de luz de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EUA y añadiendo un dispositivo de sonido para generar por medio de grabaciones, sonidos de los cantos de distintas especies de ranas macho (*Amphibia: Anura*), este canto actúa como un atrayente auditivo para *Corethrella* spp. (Méndez-López *et al.*, 2015).

Los Corethrellidae son principalmente pantropicales y son particularmente abundantes en hábitats tropicales húmedos por debajo de los 1000 metros sobre el nivel del mar (De Silva y Bernal, 2013). Las larvas de *Corethrella* son morfológicamente muy similares a las larvas de los Culícidos, éstas poseen cabezas peculiares de forma triangular y son depredadores que emboscan a sus presas en los cuerpos de agua en donde viven. Las *Corethrella* tiene una distribución entre los 50°N y 50°S, pero la mayoría de las especies se han registrado entre los 30°N y 30°S. El género se distribuye ampliamente en zonas tropicales y subtropicales donde las ranas son más abundantes (De Silva *et al.*, 2015).

En México se han reportado 11 especies: *Corethrella amazonica* Lane, *C. fulva* Lane, *C. squamifemora* Borkent, *C. appendiculata* Grabham, *C. quadrivittata* Shannon y Del Ponte, *C. ranapungens* Borkent, *C. puella* Shannon y Del Ponte, *C. aridicola* Borkent, *C. selvicola* Lane, *C. incompta* Borkent y *C. whartoni* Vargas (Borkent, 2008).

La utilidad del código de barras de la vida (DNA Barcoding) en taxonomía es un método útil para la identificación de las especies, el cual emplea la secuencia del Citocromo Oxidasa Subunidad 1 (COI) del ADN mitocondrial, comúnmente el llamado “gen de la vida” se considera al COI como una secuencia única para cada especie. El código de barras de ADN es una de las herramientas más útiles para corroborar la identidad de las especies de seres vivos basadas en la taxonomía molecular (Batovska *et al.*, 2016), además el código de barras de ADN es una técnica moderna para la identificación de las especies que no se pueden identificar morfológicamente por ser muy similares, siendo muy útil porque solo se requieren pequeñas cantidades de tejido de los especímenes para su procesamiento (Chan *et al.*, 2014).

El código de barras de la vida es un método confiable para la identificación de las especies y puede servir como la base de un sistema de bio-identificación global para los seres vivos. La región COI presenta una alta tasa de sustitución, lo que se manifiesta en alta variación de la secuencia entre especies del mismo género. El COI presenta una variación interespecífica suficientemente amplia, permitiendo buena correspondencia entre identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Hebert *et al.*, 2003).

Para la familia Corethrellidae no existen registros publicados de taxonomía empleando códigos de barras. El presente trabajo representa el primer estudio a nivel mundial del uso de esta técnica para la identificación de especies.

Este estudio pertenece a una serie de trabajos de investigación enfocados a la taxonomía y distribución de mosquitos hematófagos, principalmente Culicidae. La serie "Registros de Mosquitos" incluye diversos estudios realizados en distintas regiones geográficas de México por diferentes autores a manera de tesis de licenciatura y posgrado, los cuales son descritos a continuación:

Registros de mosquitos I: Los mosquitos de la Sierra Madre Oriental (Sierras y Llanuras Coahuilenses y Pliegues de Saltillo-Parras) de Nuevo León, México (Diptera: Culicidae) por Axel Arturo Romero Mendoza, 2012.

Registros de mosquitos II: Los mosquitos de la Sierra Madre Oriental de Coahuila, México (Diptera: Culicidae) por José Juan Hernández Rodríguez, 2010.

Registros de mosquitos III: Los mosquitos de la Sierra Madre Oriental de Nuevo León (Gran Sierra Plegada), México (Diptera: Culicidae) por José Angel Díaz López, 2012.

Registros de mosquitos IV: Los mosquitos de la Comarca Lagunera de Coahuila, México (Diptera: Culicidae) por José Rubelio Altiunar López, 2010.

Registros de mosquitos V: Los mosquitos de las Grandes Llanuras de Norteamérica de Nuevo León, México (Diptera: Culicidae) por Alan Hernández Velázquez, 2010.

Registros de mosquitos VI: Los mosquitos de la Sierra Madre Oriental (Sierras y Llanuras Occidentales) de Nuevo León, México (Diptera: Culicidae) por Josué de la Cruz Zavala, 2010.

Registros de mosquitos VII: Los mosquitos de las Grandes Llanuras de Norteamérica de Tamaulipas, México (Diptera: Culicidae) por Abel Hernández Hernández, 2012.

Registros de mosquitos VIII: Los mosquitos de la Llanura Costera del Golfo Norte (Sierra San Carlos) de Tamaulipas, México (Diptera: Culicidae) por Oscar Rubén Mandujano Grajales, 2012.

Registros de mosquitos IX: Los mosquitos de la Sierra Madre Oriental (Gran Sierra Plegada) de Tamaulipas, México (Diptera: Culicidae) por Félix Ordóñez Sánchez, 2011.

Registros de mosquitos X: Los mosquitos de la Sierra Madre Oriental (Sierras y Llanuras Occidentales) de Tamaulipas, México (Diptera: Culicidae) por Ramón Balboa Aguilar, 2011.

Registros de mosquitos XI: Los mosquitos del estado de Hidalgo, México (Diptera: Culicidae) por Félix Ordóñez Sánchez, 2013.

Registros de mosquitos XII: Los mosquitos del estado de Querétaro, México (Diptera: Culicidae) por Adelfo Sánchez Trinidad, 2013.

Registros de mosquitos XIII: Los mosquitos del municipio de Aquismón, San Luis Potosí, México (Diptera: Culicidae) por Otoniel Pérez Ventura, 2014.

Registros de mosquitos XIV: Los Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de las Sierras y Llanuras del Norte (Bolsón de Mapimí) de Coahuila, México por Yesenia Rodríguez Villanueva, 2014.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la taxonomía de las mosquitas picadoras de ranas (Diptera: Corethrellidae) en México.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar a las mosquitas picadoras de ranas depositadas en la colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la UAAAN-UL usando técnicas morfométricas y moleculares.
- Secuenciar el gen del citocromo oxidasa subunidad I de las mosquitas picadoras de ranas depositadas en la colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la UAAAN-UL.
- Elaborar un árbol de distancias genéticas para cada uno de los especímenes estudiados.
- Producir un Número Binario de Identificación (BIN) para cada una de las especies estudiadas.

1.2 Hipótesis

En la colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la UAAAN-UL existen especies de *Corethrella* que no han sido reportadas en México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Familia Corethrellidae

La Familia Corethrellidae Edwards (Diptera: Nematocera) comprende a las comúnmente llamadas “mosquitas picadoras de ranas” debido al hábito hematófago de las hembras por alimentarse exclusivamente de la sangre de las ranas macho. Actualmente en el mundo se conocen 107 especies vivientes y siete fósiles (Gil-Azevedo *et al.*, 2016). Los Corethrellidae son uno de los grupos más antiguos del orden Diptera, los cuales se encuentran dentro de la superfamilia Culicoidea, que incluyen a los mosquitos Culicidae y los mosquitos fantasma Chaoboridae. Antiguamente, los Corethrellidae se encontraban junto a los Culicidae, aunque en la actualidad, se reconocen como familias separadas (Borkent, 2008).

La familia Corethrellidae es monobásica, incluyendo únicamente al género *Corethrella* Coquillett. La mayoría de las especies se encuentran principalmente en regiones tropicales y subtropicales, donde las ranas son más diversas y abundantes. A diferencia de otros Dípteros hematófagos que son atraídos por el CO₂ que emanan de sus hospederos, las hembras de *Corethrella* son principalmente atraídas por el sonido del llamado del canto de apareamiento de las ranas macho, por lo que de esta manera localizan a sus hospederos (Amaral y Pinho, 2015).

En 1977, Sturgis McKeever informó el descubrimiento notable de que las hembras de *Corethrella* pueden ser capturadas en grandes números empleando una grabadora de casete que reproducía sonidos de cantos de distintas especies de ranas macho, colocada sobre una trampa de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EUA. Con esta trampa, McKeever colectó 566 especímenes

adultos de *Corethrella* en 30 minutos en Georgia, EUA (Borkent, 2012). Las hembras probablemente escuchen a las ranas utilizando el órgano de Johnston.

2.2 Clasificación taxonómica

La familia Corethrellidae se clasifica de la siguiente manera (McKeever y French, 1991).

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Suborden: Nematocera

Infraorden: Culicomorpha

Superfamilia: Culicoidea

Familia: Corethrellidae

Género: *Corethrella* Coquillett

2.3 Distribución geográfica de la familia Corethrellidae

La mayoría de las especies han sido registradas en regiones tropicales y subtropicales. El género *Corethrella* se encuentra distribuido entre los 50° N y 50° S y la mayoría de las especies se encuentra entre los 30° N y 30° S y por debajo de 1000 metros de elevación sobre el nivel medio del mar. Debido a que las hembras adultas son atraídas por el llamado de ranas macho para alimentarse de su sangre, las *Corethrella* están registradas en las áreas donde se distribuyen las ranas (Robert y Borkent, 2014).

En México se han reportado 11 especies: *Corethrella amazonica* Lane (Yucatán), *C. fulva* Lane (Chiapas, Veracruz, Oaxaca), *C. squamifemora* Borkent (Jalisco), *C. appendiculata* Grabham (Sonora, Veracruz, Tabasco, Yucatán, Chiapas, Guerrero, San Luis Potosí), *C. quadrivittata* Shannon y Del Ponte (Tabasco), *C. ranapungens* Borkent (Chiapas, Tabasco), *C. puella* Shannon y Del Ponte (Chiapas, Veracruz, Nuevo León, Tabasco, Yucatán, Tamaulipas), *C. aridicola* Borkent (Baja California), *C. selvicola* Lane (Yucatán), *C. incompta* Borkent (Yucatán) y *C. whartoni* Vargas (Tabasco) (Fig. 1) (Borkent, 2008).



Figura 1 Distribución de las especies de *Corethrella* en México

2.4 Biología de la familia Corethrellidae

2.4.1 Huevo

Las hembras de Corethrellidae ovipositan de 3-5 días después de adquirir una alimentación sanguínea (Borkent, 2008). Los huevos son colocados individualmente sobre la superficie del agua, los cuales tienen flotadores modificados para no hundirse, a veces se agrupan pero no se unen entre sí. Aunque la mayoría permanecen flotando hasta la eclosión. En general, los huevos eclosionan a los 2-6 días (McKeever y French, 1991).

2.4.2 Larva

El periodo larval es de 11-37 días, las larvas pueden ser encontradas en diversos hábitats acuáticos que incluyen pequeños estanques, pantanos, lagunas, charcos, axilas de bromelias, huecos de árboles y huecos de bambú. La cabeza de las larvas es triangular y alargada; la cápsula cefálica bien desarrollada y la porción posterior lateral posee una fila de espinas fuertes; los ojos son pequeños y simples; las antenas tienen pequeñas proyecciones anteriores con tres sedas cortas en el ápice; el labrum es corto, con sedas largas y cortas; las mandíbulas son bien desarrolladas, con 6-7 dientes y con dos pares de sedas lisas y aplanadas. El tórax es ensanchado. El abdomen tiene 9 segmentos; el sifón respiratorio es alargado, se encuentra en el segmento abdominal 8 y posee dos pares de espinas apicales. Las larvas pasan por cuatro instares larvarios (Borkent, 2008).

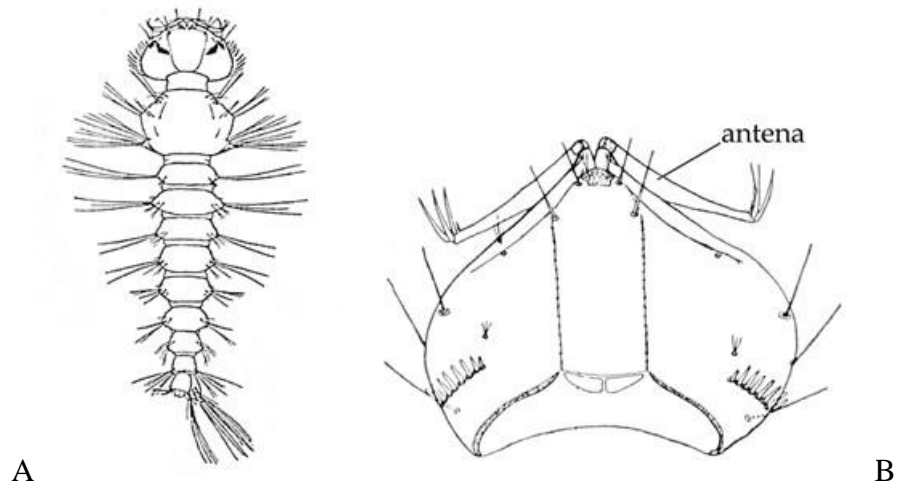


Figura 2 Larva de Corethrellidae A. Cuerpo completo B. Capsula cefálica (Borkent, 2012)

2.4.3 Pupa

El periodo de pupa es de 3-8 días, las pupas permanecen flotando en la superficie del agua y son inactivas. La cabeza y el tórax constituyen una estructura llamada cefalotórax en la que se destacan las trompetas respiratorias. El abdomen es de forma cilíndrica y aplanado dorso ventralmente con 3-7 segmentos. La paleta natatoria tiene 8 segmentos con un órgano respiratorio aplanado y el ápice de cada paleta anal tiene un par de espinas articuladas (Borkent, 2012).

2.4.4 Adulto

Los adultos de *Corethrella* son insectos pequeños con una longitud de 2 mm. La cabeza es de color café oscuro, pequeña y redonda de una longitud de 1.4-1.5 mm; los ojos son grandes y de color negro, sin ocelos; el clipeo es corto y alargado con tres sedas en la parte anterior del rostrum; los palpos tienen cinco segmentos, el primero, segundo y cuarto son cortos, mientras que el tercero y quinto son largos; las

mandíbulas son bien desarrolladas con hileras de dientes finos. Las antenas tienen un pedicelo globular y 13 flagelómeros plumosos bien desarrollados, la mayoría de los flagelómeros con anillos basales en los machos, mientras que en las hembras las antenas son filiformes. El tórax es de color café con una fila de sedas bien desarrollada dorsocentralmente; el escudete con una sola hilera de sedas alargadas y algunas más cortas; el mesonoto es oscuro; los halterios son de color más claro que el mesonoto. Las alas están bien definidas con una longitud de 0.6-2.6 mm en los machos, mientras que en las hembras es de 0.52-0.73 mm, la venación está bien desarrollada: Sc, R₁, R₂, R₃, R₄₊₅, M₁, M₂, CuA₁, CuA₂, A₁ (Fig. 3), el margen anterior de las alas tiene escamas a lo largo de ápice (Borkent, 2008).

El fémur medio es más grueso que el de las patas anteriores, en la tibia de la pata posterior presentan un parche de sedas finas, algunas de ellas se encuentran expandidas en el ápice del segmento, situadas aproximadamente a 0.25- 0.65 de la base, el ápice de los cinco primeros tarsómeros con pulvillos en la vista dorsoventral, las patas anteriores son más cortas que las patas posteriores. El abdomen tiene 8 segmentos estrechos basalmente. Los genitales del macho tienen 7 a 8 segmentos y los genitales de las hembras tienen de 8-10 segmentos (Borkent y Grafe, 2012).

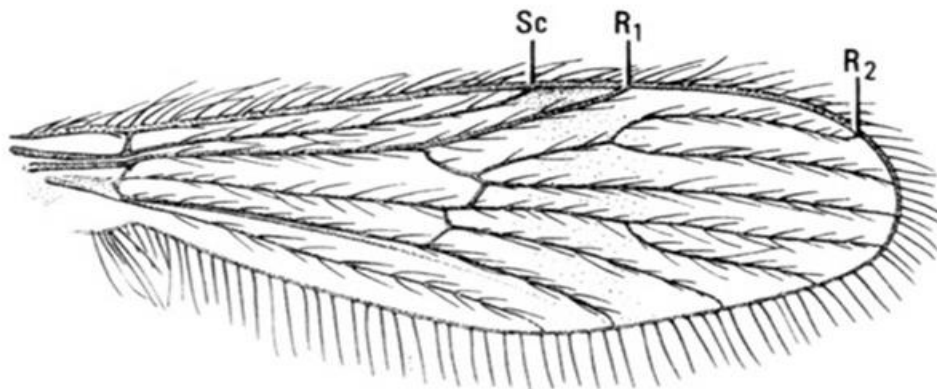


Figura 3 Venación de las alas de *Corethrella* (Borkent, 2012)



Figura 4 Adultos de Corethrellidae. Macho y hembra (Borkent, 2008)

2.5 Importancia médica y veterinaria de la familia Corethrellidae

Las hembras de la mayoría de las especies de *Corethrella* son atraídas por el canto de las ranas macho y se alimentan de su sangre para desarrollar sus huevos. Las hembras escuchan el canto de las ranas hospederas utilizando el órgano de Johnston (De Silva *et al.*, 2015). Debido a la hematofagia de *Corethrella*, algunas especies son vectores de *Trypanosoma* sp que infectan a las ranas macho (Borkent, 2008). Además, es posible que las *Corethrella* estén involucradas en la trasmisión zoonótica de virus de importancia médica y veterinaria a las ranas, evidencias recientes indican que las mosquitas picadoras de ranas son vectores de Encefalitis Equina en algunas especies de ranas. En Canadá se ha detectado la presencia del virus de la Encefalitis Equina del Oeste en algunas especies de ranas (Camp, 2006).



Figura 5 Hembras adultas de *Corethrella* alimentándose de una rana macho (Bernal y Silva, 2015)

2.6 Taxonomía por medio de herramientas moleculares

La taxonomía que utiliza características morfológicas ha sido el método mas usado para identificar las especies de mosquitos picadoras de ranas; sin embargo la identificación morfológica es difícil cuando la experiencia es limitada o cuando los caracteres se dañan debido a la manipulación y/o preservación incorrecta de la muestra. Por lo tanto, existe la necesidad de usar alternativas para la identificación de estos insectos. El código de barras de ADN es una de las herramientas útiles para corroborar la identificación de las especies de insectos basadas en la taxonomía clásica, este método se basa en el concepto de que cada especie posee una identidad genética única (Chan *et al.*, 2014).

Con la ayuda de la taxonomía molecular y el desarrollo de secuenciación de aminoácidos en las proteínas y nucleótidos de las moléculas de ADN y ARN, se han podido comparar organismos a través de los genes mitocondriales. Estos genes se han convertido en la principal herramienta molecular para analizar la diversidad

genética de los animales. La región COI presenta una alta tasa de sustitución, lo que manifiesta una alta variación de la secuencia entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003).

El código de barras de la vida se basa en la secuenciación de una región de ADN consenso, siendo un método útil para la identificación complementaria de las especies vivientes, el cual emplea secuencias de ADN mitocondrial, comúnmente llamado gen de la vida (Citocromo Oxidasa Subunidad 1), con el propósito de un sistema de identificación más eficaz para facilitar la conservación, conocimiento y uso sustentable de la biodiversidad (Batovska, *et al.*, 2016).

El uso de códigos de barras de ADN ha sido presentado como herramienta de identificación taxonómica de especímenes y como mecanismo para descubrir especies crípticas. Los códigos de barras de especímenes desconocidos que no concuerden con ninguna especie presente en la base de datos de referencia pueden sugerir que la base de datos está incompleta o que se trata de una posible nueva especie. Por otro lado, los códigos de barras pueden revelar divergencia genética muy alta dentro de una misma especie putativa sugiriendo en algunos casos la existencia de especies crípticas (Silva *et al.*, 2011).

Entre las utilidades del código de barras de ADN, se destacan: 1) es una técnica moderna para la identificación de las especies que no se pueden identificar morfológicamente por ser muy similares y 2) solo se requiere pequeñas cantidades de tejido de los especímenes para su procesamiento (Chan *et al.*, 2014).

2.7 La colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna

En el Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, se encuentra depositada la Colección de mosquitos (CC-UL), la cual contiene varias familias de Diptera hematófaga, principalmente Culicidae, aunque también existen otras familias como Simuliidae, Psychodidae (Phlebotominae), Ceratopogonidae y Corethrellidae. Esta colección forma parte de la colección de insectos “Maria Sibylla Merian” depositada en la misma institución. La colección en general incluye diferentes órdenes como Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Orthoptera y Lepidoptera, entre otros. Las mosquitas picadoras de ranas depositadas en esta colección fueron colectadas durante colectas de mosquitos Culícidos desde el año 2013 en diferentes regiones y estados de México, preservadas en diferentes medios y a diferentes temperaturas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción de las áreas de estudio

Mosquitas picadoras de ranas fueron colectadas en los estados de, San Luis Potosí y Tabasco. La descripción general para cada estado, así como información fisiográfica de los estados en donde las mosquitas picadoras de ranas fueron colectadas son descritas a continuación; algunos datos geográficos y ecológicos son mostrados en el Anexo 1.

3.1.1 San Luis Potosí

El estado de San Luis Potosí, se localiza en la parte centro oriente de la república Mexicana, se ubica entre las coordenadas geográficas 21°09'35" y 24°33'25" de latitud norte así como 98°19'40" y 102°17'30" de longitud oeste. Colinda al norte con Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz e Hidalgo y al suroeste con Querétaro, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas. Ocupa el número 15 en extensión territorial entre las entidades Federativas, con una superficie de 62,304.74 km². San Luis Potosí, forma parte de la planicie cálida de la Llanura Costera del Golfo Norte (INEGI, 1985) (Fig. 6).

San Luis Potosí posee un clima seco y semiseco, con una temperatura media anual de 21°C y una precipitación anual con un promedio de 950 mm. En cuanto a los tipos de vegetación, la superficie estatal está cubierta en un 48.9% por matorral y los matorrales cubren la mayor parte de la superficie del Oeste de la entidad y gran parte del centro predomina el matorral xerófilo. El 21% por zonas agrícolas, el 12% por pastizales y estos se hayan principalmente en la llanura costera y en las llanuras al centro de la entidad, el 10.6% por bosques y se hayan sobre las cimas de los

principales sistemas montañosos al centro de la entidad, el 5.7% por selva, la que se encuentra en el costado este de la Sierra Oriental donde las precipitaciones abundan, y el 1.8% por otros tipos de vegetación, cuerpos de agua y zonas urbanas (INEGI, 1985).

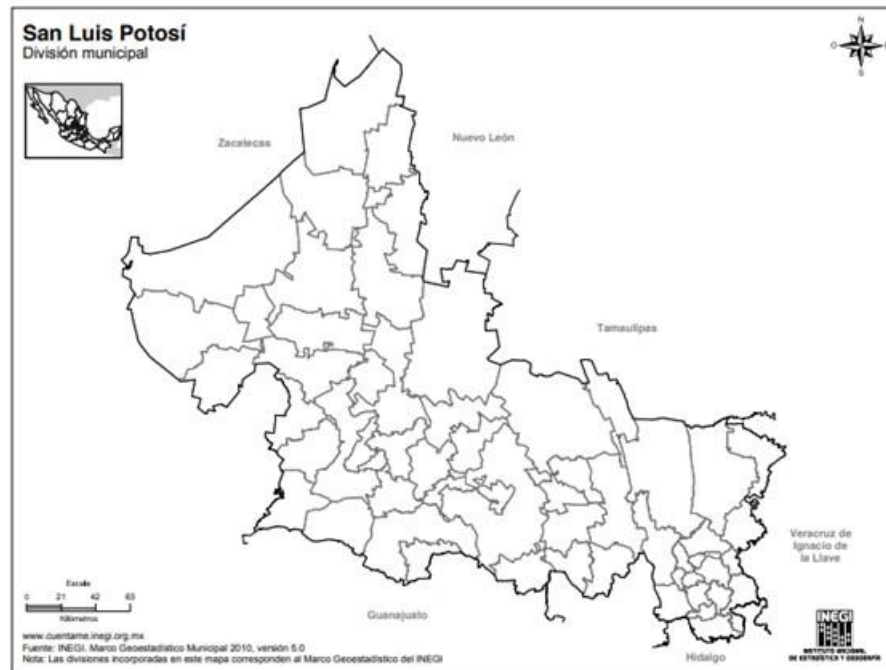


Figura 6 Estado de San Luis Potosí, México

3.1.2 Tabasco

El Estado de Tabasco, está ubicado en el sureste de la República Mexicana, entre las coordenadas geográficas $18^{\circ} 39'$ y $17^{\circ} 15'$ de latitud norte; $91^{\circ} 00'$ y $94^{\circ} 07'$ de longitud oeste. Colinda al norte con el Golfo de México y Campeche y la República de Guatemala; al sur con Chiapas y al oeste con Veracruz. Comprende una superficie de 24,747 km² que representa el 1.3% del total del país y sitúa al estado en el lugar 24 en cuanto a extensión territorial (INEGI, 2001) (Fig. 8).

El clima del estado de Tabasco es cálido y húmedo con abundantes lluvias en verano con una temperatura de 26°C y una precipitación media anual de 2000 mm; en la porción sur es cálido húmedo con lluvias todo el año, siendo la zona más lluviosa de Tabasco con 4000 mm de precipitación media anual y temperatura 26°C en una pequeña porción del Noroeste. En cuanto a la vegetación es la que se desarrolla en zonas inundables de agua salobre donde crecen los manglares y en agua dulce crece vegetación acuática y selva, que en su mayor parte ha sido talada para dar paso a las actividades agrícolas y ganaderas (INEGI, 2001).

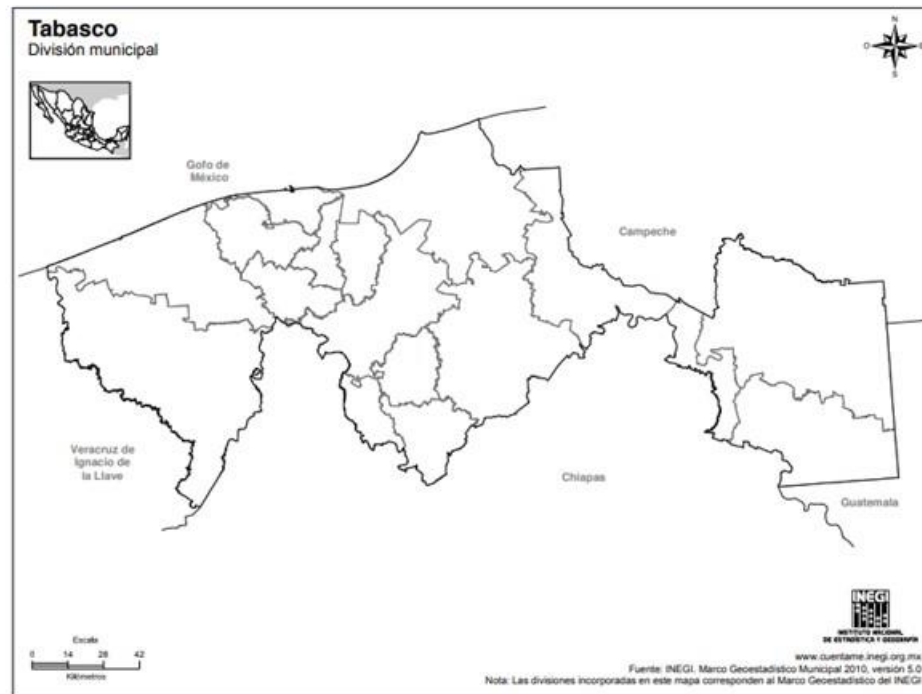


Figura 7 Estado de Tabasco, México

3.2 Colecta de mosquitos picadoras de ranas

Todos las mosquitos picadoras de ranas depositadas en la Colección de mosquitos de la UAAAN-UL fueron colectadas en su estado adulto, empleando

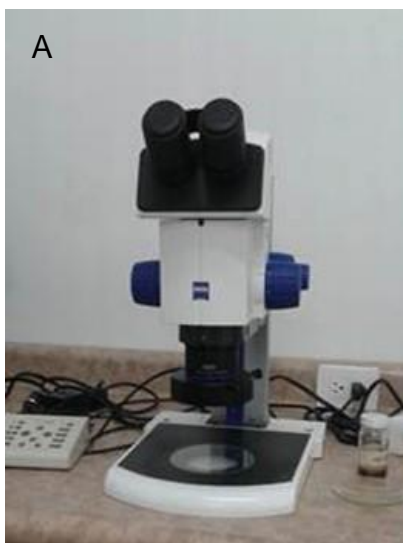
trampas de luz CDC (Anexo 1), algunas trampas se les colocó una bocina portátil reproduciendo el sonido de apareamiento de diferentes especies de ranas macho a una intensidad acústica de 50 dB durante un periodo de 4-5 horas consecutivas, además se le colocó una torunda de algodón impregnada con 0.3 ml de octanol. Un total de 10 trampas se colocaron por noche y suspendidas a una altura de 1.5 metros de altura respecto al nivel del suelo. Las trampas se colocaron a una separación de 100 metros una de la otra. Todos los especímenes colectados se depositaron en viales con alcohol al 70% para su preservación, los viales se etiquetaron y se transportaron al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología de la UAAAN-UL para su procesamiento taxonómico.



Figura 8 Trampa de luz CDC con bocina que reproduce el sonido del canto de ranas

3.3 Metodología para la identificación taxonómica y molecular de las muestras.

Se revisó el catálogo de registros de colecta (cédulas) que comprenden todos los viajes de campo de mosquitos depositados en la colección de mosquitos (CC-UL) del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna (UAAAN-UL) en la búsqueda de especímenes reportados como Corethrellidae y/o *Corethrella* sp. Todas las mosquitas picadoras de ranas depositadas en la colección CC-UL estaban preservadas en viales de vidrio y plástico con alcohol 70% y en refrigeración (4°C). Los estados en donde se encontraron especímenes de la familia Corethrellidae fueron San Luis Potosí y Tabasco, por lo que estos son considerados como el área de estudio de esta investigación (Fig. 6 y 7). Una vez recuperado todo el material correspondiente a la familia Corethrellidae, éste fue revisado con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Zeiss® Discovery V8) para corroborar su identidad taxonómica (Fig. 9).



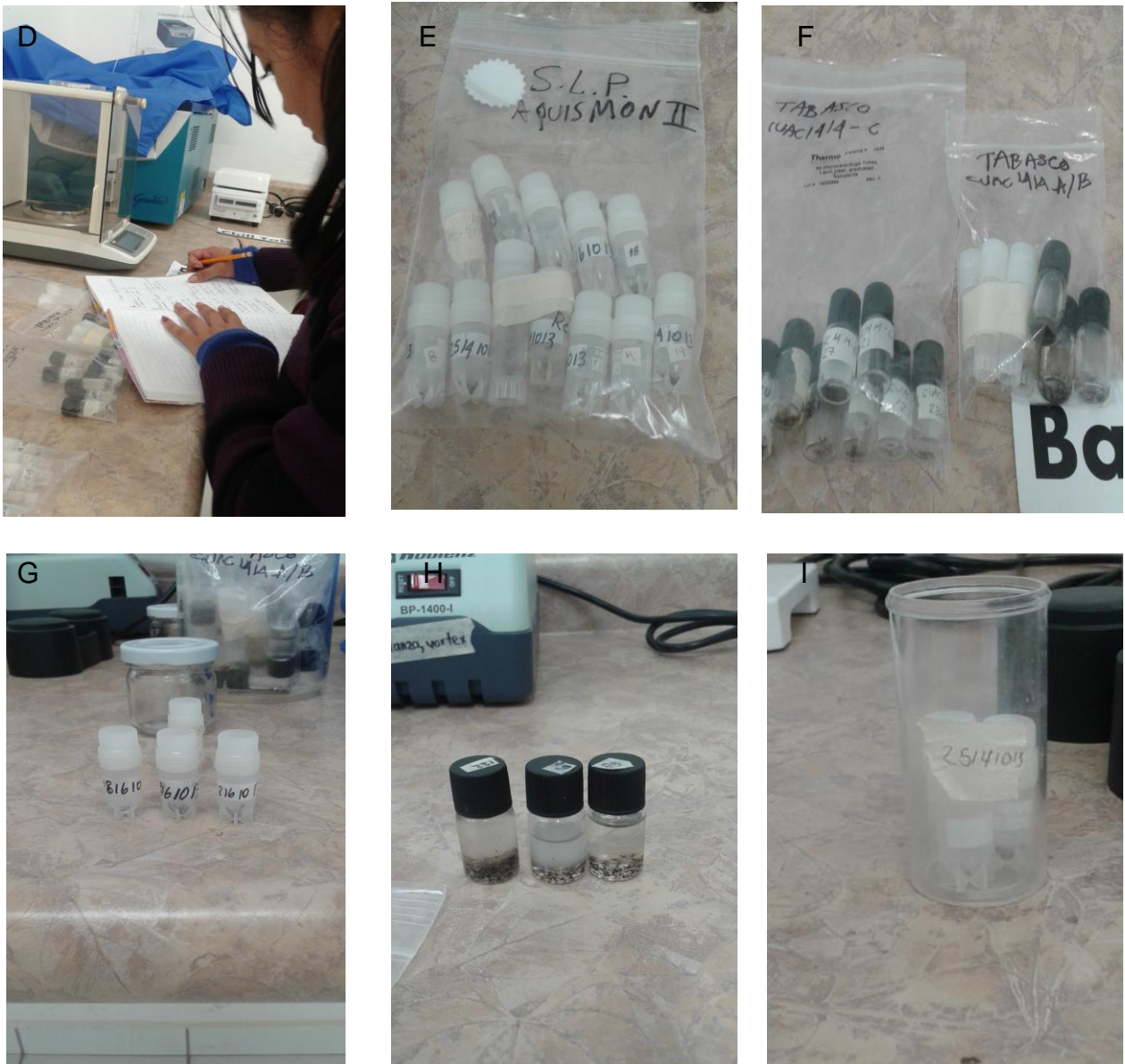


Figura 9 Acomodo del material de Corethrellidae. A. Microscopio estereoscópico, B. Cédulas de colecta, C. Refrigerador donde el material se preservó, E. Revisión de bitácora, F-I. Viales con *Corethrella* provenientes de los estados de San Luis Potosí y Tabasco

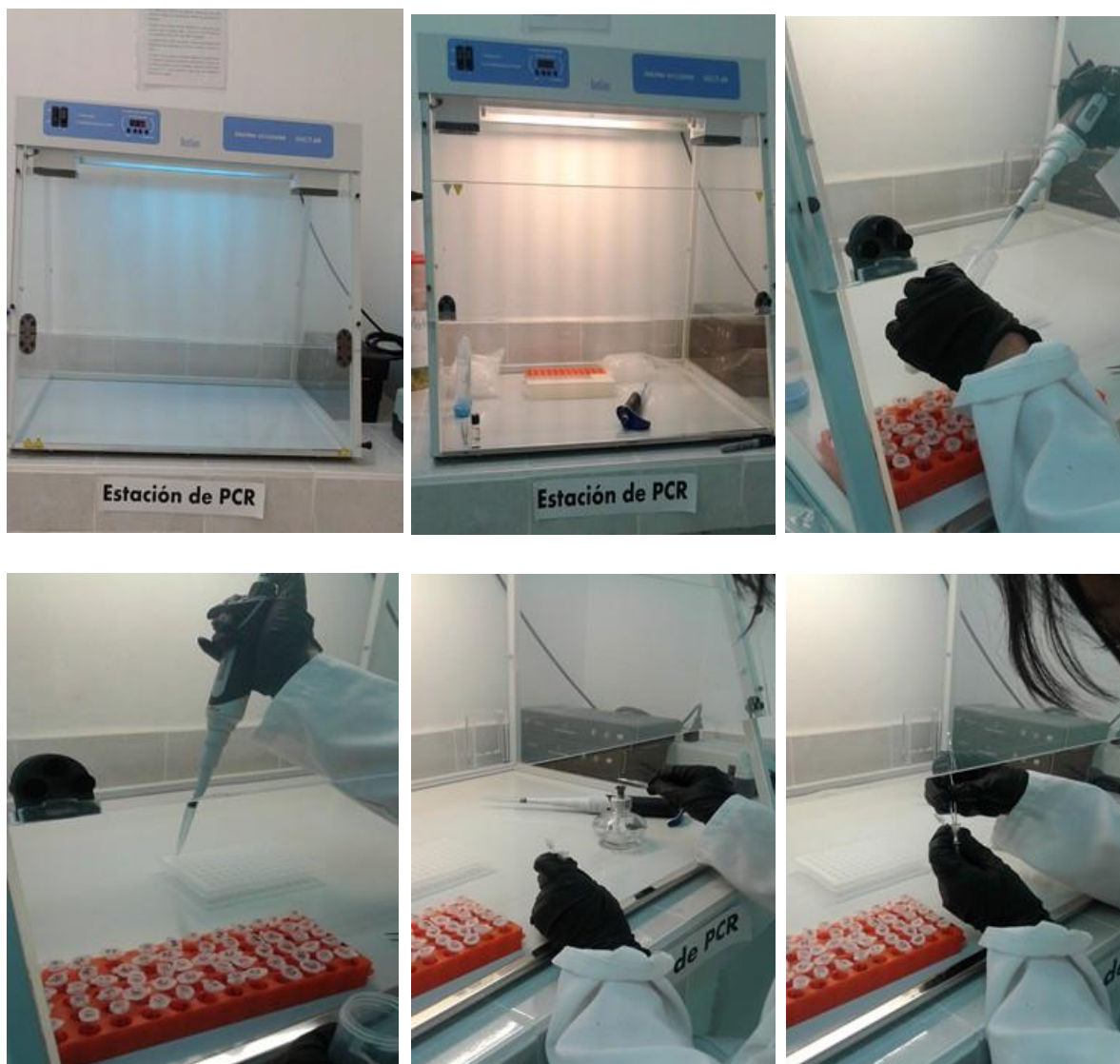
3.3.1 Elaboración de las placas para código de barras de ADN

El procedimiento para elaborar las placas de código de barras se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología la UAAAN-UL. El procedimiento es descrito a continuación (Fig. 10):

- 1.- Para comenzar a trabajar se tuvo que tener puesta la bata de laboratorio, guantes de látex y cubrebocas para evitar cualquier riesgo de contaminación; con el equipo de protección personal puesto, se desinfectó la cabina de luz ultravioleta (UV) empleando alcohol al 70%, para evitar riesgos de contaminación durante la preparación de las muestras.
- 2.- Una vez desinfectada la cabina UV, se activó la luz UV durante 15 minutos en modo “2-UV recirculator/ UV light”. Después se encendió la lámpara de luz ultravioleta y se sometió a esterilización luminosa los materiales de trabajo: 1 pinza entomológica de acero inoxidable, pipetas volumétricas de 200 microlitros con caja esterilizada, un mechero de alcohol, etanol del grado molecular 98%, frasco para desechar las puntillas y las placas Eppendorff® de PCR de 96 pozos.
- 3.- Se comenzó con realizar el registro de cada uno de los especímenes en una bitácora para evitar confusiones, los datos de la bitácora incluyeron: número de pozo, número de cédula, tipo de preservación de ácidos nucleicos y la entidad federativa de donde la muestra provenía.
- 4.- Se encendió el mechero de alcohol y se comenzó a preparar la primera placa Eppendorff® para PCR de 96 pozos. Con la pipeta volumétrica de 200 microlitros se colocó una puntilla previamente esterilizada y cuidadosamente se agregaron 300 mililitros de etanol grado molecular 98% a cada pocillo de la placa, la pinza entomológica se pasó dos veces sobre la flama del mechero para esterilizarla y con ella se sacó al espécimen completo del vial dónde provenía. En cada pozo se colocó una mosquita *Corethrella* sp., una vez que la placa se completó con los especímenes (dejando el último pocillo vacío para el control positivo), se procedió

a cubrir la placa usando las tiras de tapas, siendo un total de 95 mosquitas por placa (n=95).

5. Se completaron tres placas, las cuales se preservaron en el refrigerador a una temperatura de 4°C. Después de 2 semanas se procedió a realizar el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos.



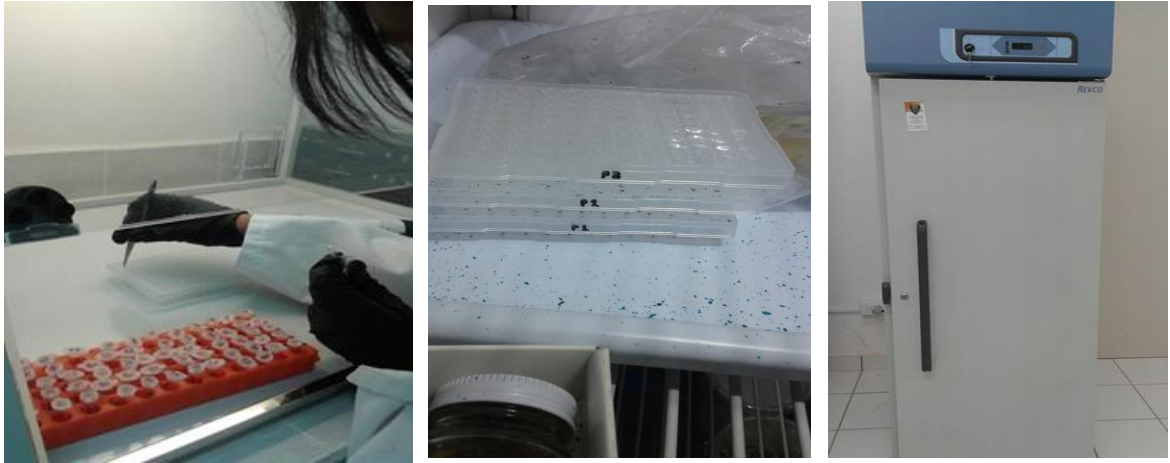


Figura 10 Elaboración del llenado de las placas Eppendorf® para PCR

3.3.2 Extracción de ácidos nucleicos (ADN)

Para la extracción de ADN se usó la técnica “no destructiva del Hot-Shot para evitar dañar a las mosquitas las cuales serían posteriormente montadas e identificadas con técnicas clásicas de morfometría. La técnica de extracción del Hot Shot es descrita a continuación:

Antes de comenzar la extracción de ADN es primordial que todas las muestras se deben organizar en formato de placa BOLD, la hoja de cálculo de Excel con toda la información de las muestras se prepara y carga en BOLD (usando el sitio web www.barcodingoflife.org).

1. Las placas se colocaron en un bloque de PCR-Heat durante 1-2 minutos para evaporar el etanol.
2. Se agregan 50 μ l de lisis alcalino a la placa, dejando la posición 12 H (pozo 96) para el control positivo.
3. Las placas / muestras se sonicaron durante 20 minutos en baño de agua.

4. Las placas se incubaron en el PCR a 95°C durante 30 minutos y se dejó enfriar durante 5 minutos a 4°C.
5. La placa se centrifugo durante 3 minutos a 3.000 rpm y se añadió 50 µl del reactivo neutralizado por pocillo y las placas se centrifugaron de nuevo durante 10 minutos a 3.00 rpm para la combinación del reactivo alcalino de lisis y el reactivo neutralizante.
6. Se extrajo la plantilla de ADN prestando atención para no dañar las muestras en otra placa que ahora se almacena a -80°C hasta el procesamiento del día siguiente.
7. Se agregaron 150 µl de etanol y se cubrieron todos los pozos con tiras de tapas nuevas para su almacenamiento.

Se cargaron registros detallados de especímenes e información de secuencia (incluidos archivos de rastreo) en la base de datos barcode de Life (www.boldsystems.org).

3.3.3 Secuenciación y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las secuencias fueron obtenidas amplificando y secuenciando el fragmento de terminación 5' del gen (COI-5p) con 658 pares de bases (pb). Los oligonucleótidos utilizados fueron los desarrollados por Folmer *et al.*, 1994 que son considerados los estándares para amplificar la región del gen COI (Hebert *et al.*, 2003): (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3').

Los productos de PCR fueron obtenidos utilizando el kit Qiagen PCR con un volumen final de 50 µl siguiendo el siguiente mix de reacción 2 µl de muestras de

ADN templado 25 µl H₂O, 5 µl 10x NH₄ buffer, 5 µl de dNTPs (2 mM/ µl I), 2.5 µl de MgCl₂ (25 pmol), 0.1 µl Bioline Taq Polimerasa, 5 µl de cada oligonucleótido (cada uno a 10 pmol/µl) y 0.38 µl de albumina de suero bovino (20 mg/ml). El ciclo térmico fue de desnaturalización inicial a 94°C por 1 minuto, 5 ciclos de 94°C por 1 minuto; alineamiento a 45-50°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 1.5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1.5 minutos y 72°C por 1 minuto con una extensión final a 72°C por 5 minutos.

3.3.4 Electroforesis en Gel de agarosa

Para la preparación del gel de agarosa al 1.5% y posterior visualización de las muestras en la cámara de electroforesis, se empleó buffer TBE al 1x. Se mezclaron 25 gr de agarosa con 25 ml de TBE 1x en un matraz Erlenmeyer hasta obtener una muestra homogénea para posteriormente calentarla en una parrilla eléctrica hasta el punto de ebullición. Cuando el producto se encontró nuevamente a temperatura ambiente se vertió sobre una cámara de electroforesis. Para cargar las reacciones PCR se colocaron 5µl de gel red (buffer de carga) y 5µl del producto de ADN en cada uno de los pozos del gel, se corrió a 70 voltios durante 30 minutos. Para visualizar el gel de agarosa se empleó foto documentador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems); mostrando bandas de tamaño correcto que fueron secuenciadas en ambas direcciones utilizando ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

3.3.5 Alineación de secuencias genómicas

El alineamiento múltiple de las secuencias de ADN de las regiones de COI, se realizó con el programa Muscle, en la interface "The Molecular Evolutionary Gentecis

Analysis” (MEGA) versión 6 con un máximo de 8 interacciones para cada una de las regiones individuales. De las matrices resultantes del alineamiento múltiple de las regiones de ADN mitocondrial, fue concentrando el taxón por taxón sin ningún proceso adicional.

3.3.6 Elaboración de cladogramas de diversidad de distancias genéticas (NJ-Tree)

Los cladogramas se realizaron con el software MEGA versión 6 de 1000 réplicas de secuencias tomadas al azar utilizando el método de Neighbor-Joining (NJ Tree), utilizando el algoritmo de distancia Kimura 2-parámetro (K2P) para representar su patrón de agrupamiento. Las alineaciones de las secuencias fueron examinadas en el programa MEGA versión 6. Para la generación de los cladogramas se usó el algoritmo de K2P. Los árboles NJ se exportaron como archivos JPG en Adobe Acrobat con 8 interacciones, y luego se usó Adobe Photoshop CS3 (v. 10.0.1) para editarlos (Hernández-Triana *et al.*, 2017).

3.3.7 Elaboración de cladogramas de inferencia filogenética

El porcentaje para replicar cladogramas en el que los taxa asociados agrupados en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas. El cladograma se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Kimura 2-parámetros y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de base por sitio.

3.3.8 Obtención del Número Binario de Identificación (BIN)

Después de su carga en BOLD Systems®, a la mayoría de las secuencias de códigos de barras de más de 500 pb se les asignó un Número Binario de Identificación (BIN). El BIN es un sistema taxonómico provisional que segrega secuencias de códigos de barras similares. Se generó una NJ en negrita y se mapearon todos los BINS para cada morfoespecie. Se analizó la discordancia taxonómica en el conjunto de datos mediante el uso de capacidades BOLD, que proporciona un medio para confirmar la concordancia entre los grupos de secuencias de códigos de barras y las designaciones de las especies.

3.4 Fijación y montaje de los especímenes

El procedimiento utilizado en esta investigación para el montaje de las mosquitas picadoras de ranas fue el descrito por Borkent y Spinelli (2007), el cual se describe a continuación:

1. Se registró en una bitácora, los registros que se iban realizando diariamente durante el proceso del montaje, lo cual incluía, número de pozo, numero de laminilla, numero de cédula y tipo de especímenes.
2. Se colocaron los especímenes en vidrio de Siracusa y se le agregó alcohol al 96%, los vidrios se enumeraron (1-14) para no tener confusión, los adultos colocados en los vidrios se colocaron bajo el microscopio estereoscopio y se les cortó las alas sujetando la base del ala con una pinza fina, cada una de las alas se colocó en un vial con alcohol al 96 %.
3. Se separó la cabeza, el tórax y el abdomen del espécimen y en un vial se agregó un 1/3 a 1/4 de KHO al 8% y en cada vial se colocaron las secciones de cada

especímen. Cada uno de los viales se enumeró con un lápiz para que pueda asociarse con las alas que estaban en el alcohol al 96%.

4. Se colocaron los viales con KHO al 8% en el Termoblock con una temperatura de 78.1°C y se dejaron las muestras 2-5 minutos para que los músculos de los especímenes se maceraran.
5. El siguiente paso requería de mucha velocidad porque los especímenes se dañan si permanecían en KHO caliente durante demasiado tiempo. Se retiraron cada una de las partes del espécimen en el vidrio de Siracusa con KOH al 8% y cada una de las muestras se colocaron bajo el microscopio y con la pinza se apretaban suavemente sin romper las partes del espécimen. Los especímenes se colocaron en ácido acético y se dejaron durante 15 minutos.
6. Los especímenes se colocaron en isopropanol durante 15 minutos.
7. Se retiró el isopropanol con pipeta Pasteur y se agregó la misma cantidad de Cellosolve dejándolo reposar durante 30 minutos.
8. Una vez finalizado el proceso de deshidratación, se colocó una plantilla bajo el microscopio y con el lápiz con punta de diamante se enumeró el portaobjetos y se colocó una gota de euparal y sobre el euparal se colocaron las alas, cabeza tórax y abdomen.
9. Una vez colocadas en euparal las secciones del espécimen se retiró las patas derechas y las otras tres patas se colocaron a un lado del abdomen.
10. El tórax se colocó de manera que el lado izquierdo quedara en vista lateral. La cabeza se colocó de manera frontal y las antenas se extendieron.
11. Las muestras fueron colocadas en charolas de incubación y una vez terminada el montaje de los especímenes en los portaobjetos las charolas fueron colocadas

en el horno de secado a una temperatura de 40-50 ° C. Después de 24 horas se añadió una gota de euparal a cada una de las muestras y cuidadosamente se colocó el cubreobjetos sobre cada preparación.





Figura 11 Montaje de los especímenes de Corethrellidae

3.5 Identificación taxonómica

La identificación taxonómica de las especies de *Corethrella* se realizó siguiendo las claves de Borkent (2008).

IV. RESULTADOS

Un total de 196 mosquitas picadoras de ranas fueron analizadas en la presente investigación (64 de San Luis Potosí y 132 de Tabasco). En el estado de San Luis Potosí se obtuvieron 2 sitios de colecta con presencia de *Corethrella* spp. (Cédulas No. 25141013-PM y 18161013-SIT), ambas cédulas corresponden a la expedición No. AQUISMÓN II, con fecha del 12 de octubre del 2013 al 16 de octubre del 2013, en el municipio de Aquismón (Anexo 1). En el estado de Tabasco se obtuvieron 9 sitios de colecta con presencia de *Corethrella* spp. (Cédula No. 14170714-C) de la expedición No. CUAC1414-A, con fecha del 17 de julio del 2014 al 24 de julio del 2015, en el municipio de Comalcalco; (cédulas 07200715-T, 06260715-PC) de la expedición No. CUAC1414-B, con fecha del 18 de julio del 2015 al 28 de julio del 2015, en los municipios de Teapa y Centla (Anexo 1); (cédulas 15161115-C, 13271015-VL, 10211015-CH, 02041115-NH, 23201015-LC, 01041115-NH) de la expedición No. CUAC1414-C, con fecha del 18 de octubre del 2015 al 18 de noviembre del 2015, en los municipios de Comalcalco, Tacotalpa, Huimanguillo y Tenosique (Anexo 1) (Tabla 1).

Cuadro 1 Compendio taxonómico de las *Corethrella* de la colección CC-UL

Cédula	Taxa	BIN	No. sec.	Cédula	Taxa	BIN	No. sec.
25141013-PM	<i>C. appendiculata</i> 1	BOLD:ADI5757	27	15161115-C	<i>C. quadrivittata</i>	BOLD:ADI8208	1
	<i>Corethrella</i> sp. 1	BOLD:ADJ3958	3		13271015-VL	<i>C. appendiculata</i> 2	BOLD:ADJ2979
	<i>Corethrella</i> sp. 2	BOLD:ADJ1057	2			<i>C. puella</i>	BOLD:ADI7309
18161013-SIT	<i>C. appendiculata</i> 1	BOLD:ADI5757	17		<i>C. selvicola</i>	BOLD:ADI5565	1
	<i>Corethrella</i> n. sp. 1	BOLD:ADI8036	2	10211015-CH	<i>C. puella</i>	BOLD:ADI7309	8
14170714-C	<i>C. amazonica</i>	BOLD:ADI5867	1			<i>Corethrella</i> n. sp. 3	BOLD:ADI7310
	<i>C. edwardsi</i>	BOLD:ADI6014	1	02041115-NH			
	<i>C. quadrivittata</i>	BOLD:ADI8208	3			<i>Corethrella</i> n. sp. 4	BOLD:ADI7310
	<i>C. vittata</i>	BOLD:ADI9178	6	23201015-LC			
	<i>Corethrella</i> n. sp. 2	BOLD:ADI6344	13			<i>Corethrella</i> sp. 3	BOLD:ADJ1889
	<i>Corethrella</i> n. sp. 3	BOLD:ADI7310	37	01041115-NH	<i>C. aridicola</i>	-----	0
07200715-T	<i>C. appendiculata</i> 2	BOLD:ADJ2979	1			<i>C. puella</i>	BOLD:ADI7309
06260715-PC					<i>C. selvicola</i>	BOLD:ADI5565	2
	<i>C. squamifemora</i>	BOLD:ADI7712	2				
	<i>Corethrella</i> n. sp. 2	BOLD:ADI6344	1				
	<i>Corethrella</i> n. sp. 4	BOLD:ADJ1531	1				

Listado taxonómico de las mosquitas picadoras de ranas (Diptera: Corethrellidae) de la colección de mosquitos del departamento de Parasitología de la UAAAN-UL (CC-UL).

4.1 *Corethrella amazonica* Lane

Corethrella amazonica Lane, 1939

Corethrella (Lutzomiops) amazonica: Lane, 1942

Corethrella amazonica: Lane, 1953

Corethrella (Lutzomiops) coutinhoi: Lane, 1942

Lutzomiops coutinhoi Lane, 1951

Localidad tipo: Porto Velho, Rio Madeiran, Rondonia y Brasil.

Diagnosis: Flagelómeros 1-3 alargados; alas sin bandas (Fig. 12-A); tórax uniformemente café claro, halterios tan oscuros como el escutelo (Fig. 12-B) el trocánter posterior pálido, contrastando con la tibia oscura; fémur y tibia posterior café pálido y la base del fémur ligeramente pálido (Fig. 12-C).

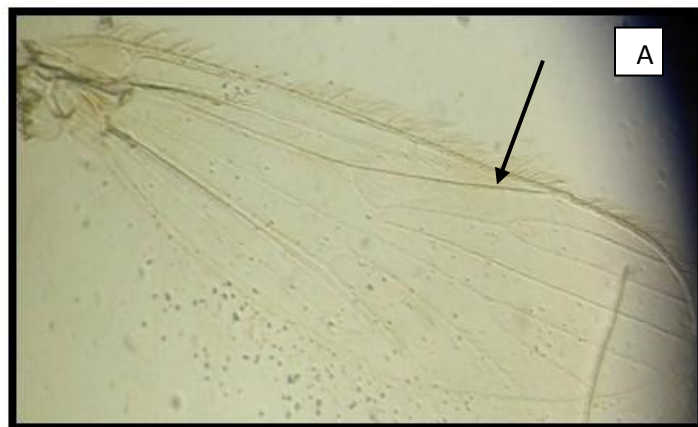




Figura 12 Características distintivas de *C. amazonica*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en la localidad de Cárdenas 1era Sección, municipio de Comalcalco, en un ambiente rural.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI5867

4.2 *Corethrella appendiculata* Grabham

Corethrella appendiculata Grabham, 1906

Corethrella arborealis Shannon y Del Ponte, 1928

Corethrella confusa Lane, 1939

Localidad tipo: Kingston, Jamaica.

Diagnosis: Posee una banda transversal media distintiva en las alas, escamas oscuras basales, pero estas nunca cubren toda la base del ala (Fig. 13-A); tórax café oscuro (Fig. 13-B), mitad del abdomen café oscuro (Fig. 13-C); base de la tibia

posterior pigmentada y oscura (que contrasta con el fémur posterior con el ápice pálido) (Fig. 13-D); fémures con escamas anchas (Fig. 13-E).

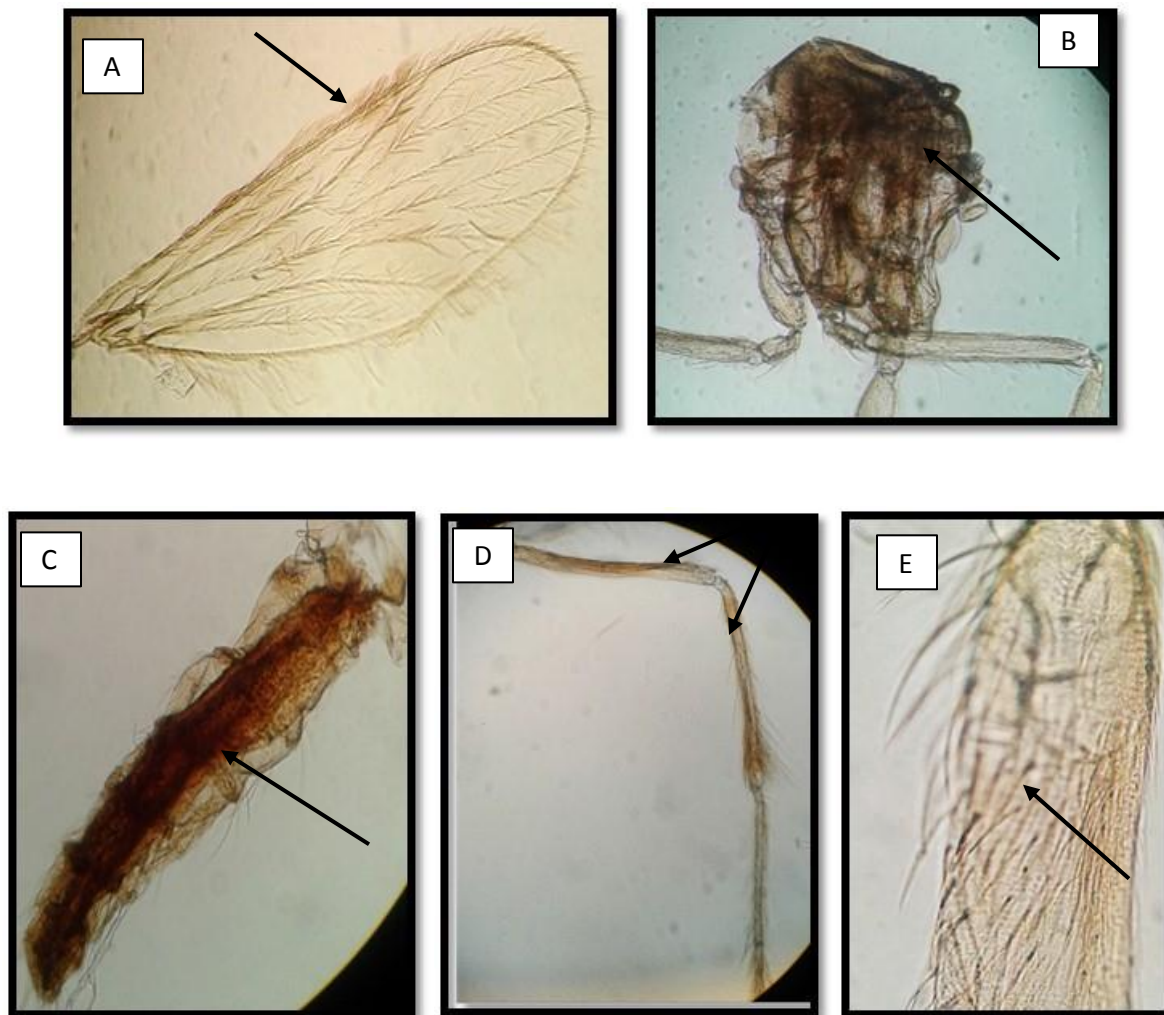


Figura 13 Características distintivas de *C. appendiculata*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en los estados de San Luis Potosí, en la localidad Puerto de Mamey, municipio de Aquismón y en el estado de Tabasco, en las localidades de Grutas del Cocona, Teapa y Villa Luz, Tacotalpa.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI5757 (*C. appendiculata* 1), BOLD: ADJ2979 (*C. appendiculata* 2).

4.3 *Corethrella aridicola* Borkent

Corethrella laneana Belkin y McDonald, 1955

Diagnosis: Clípeo alargado; flagelómeros 2 y 3 alargados; ala con una banda transversal media distintiva, pero con escamas oscuras ausentes en CuA₂ (Fig. 14-A); tórax café claro (Fig. 14-B); abdomen café; base de la tibia posterior más pigmentada, que contrasta con el fémur posterior con el ápice pálido) (Fig. 14-C, D) y mitad del fémur sin escamas (Fig. 14-E).

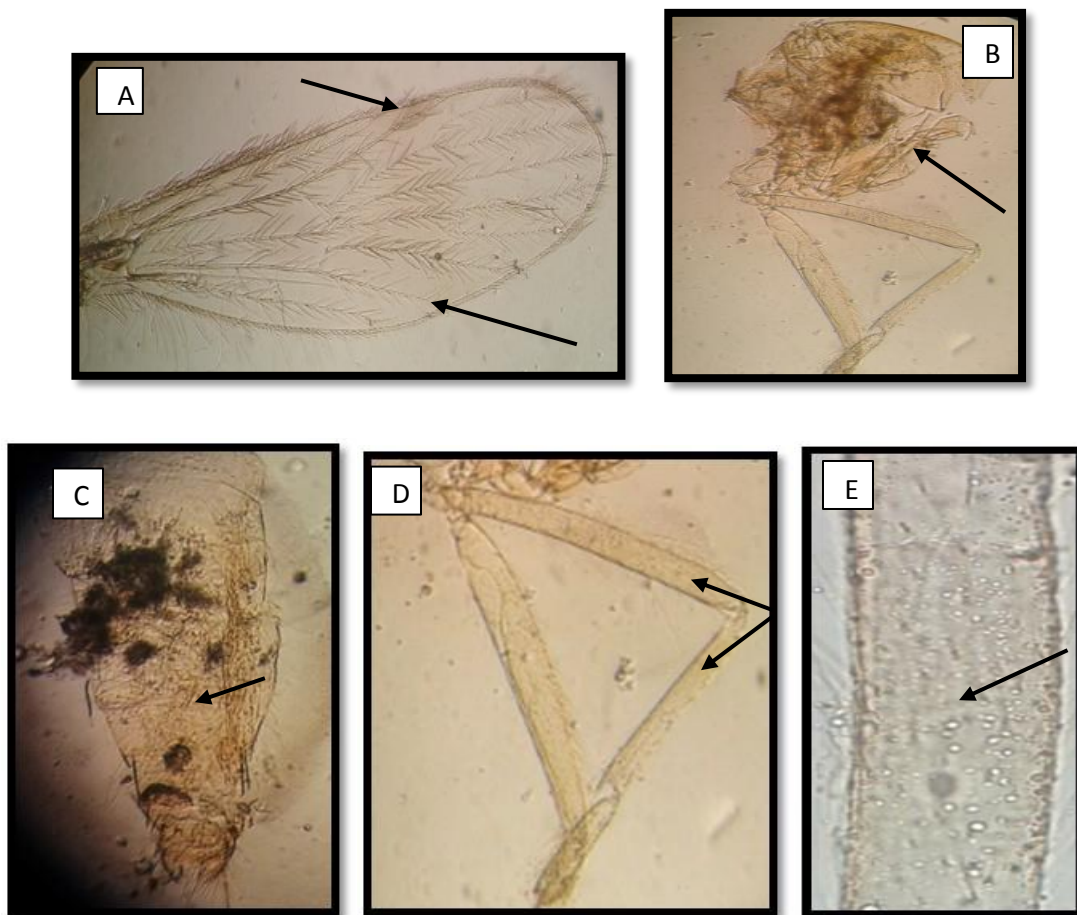


Figura 14 Características distintivas de *C. aridicola*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco, en la localidad de Niños Héroes, Tenosique.

4.4 *Corethrella edwardsi* Lane

Corethrella edwardsi Lane, 1942

Localidad tipo: Salobra, Mato Grosso, Brasil.

Diagnosis: Ala con cuatro bandas transversales, una de estas bandas justo distal en el arculus y otra situada en la vena sub apical (sin escamas oscuras en estas venas que se extienden hasta el ápice del ala) (Fig. 15-A); el halterio pálido o café claro y la tibia posterior con pigmentación más oscura en la basal y apical (Fig. 15-B, C).

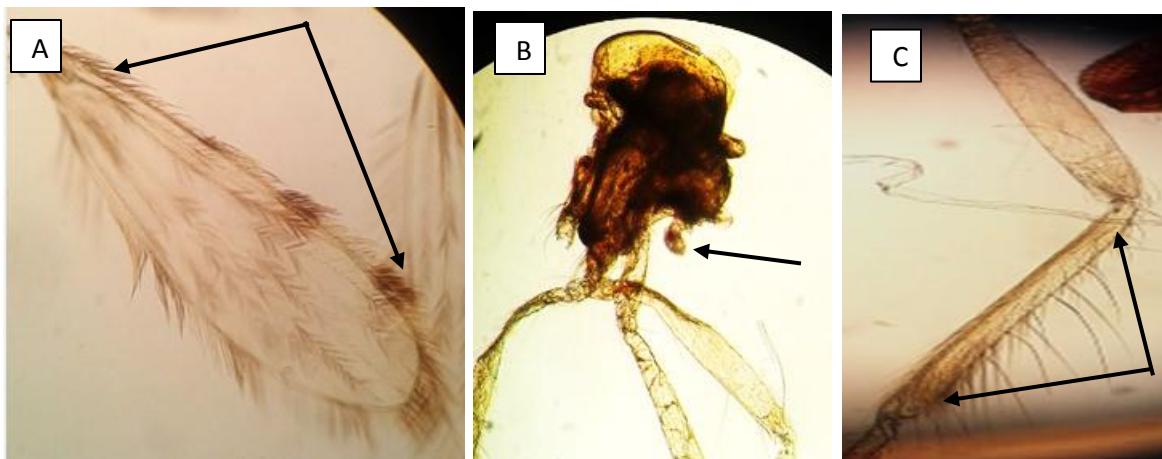


Figura 15 Características distintivas de *C. edwardsi*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco, en la localidad de Cárdenas 1era Sección, Comalcalco.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI6014

4.5 *Corethrella puella* Shannon y Del Ponte

Corethrella puella Shannon y Del Ponte, 1928

Corethrella puebla Shannon y del Ponte, 1928

Corethrella laneana Vargas, 1946

Corethrella metcalfi McKeever, 1988

Localidad tipo: Ledesma, Canitas Viejo, Jujuy, Argentina.

Diagnosis: Clípeo alargado (Fig. 16-A); flagelómeros 2 y 3 alargados (Fig. 16-B); ala con una banda transversal media distintiva con escamas oscuras ausentes en R4+5 y CuA₂ (Fig. 16-C); tórax café oscuro (Fig. 16-D); fémur medio café oscuro y del mismo color que la base del fémur posterior, base de la tibia posterior pigmentada oscuramente (con el ápice del fémur posterior pálido) (Fig. 16-E); fémur medio sin escamas.

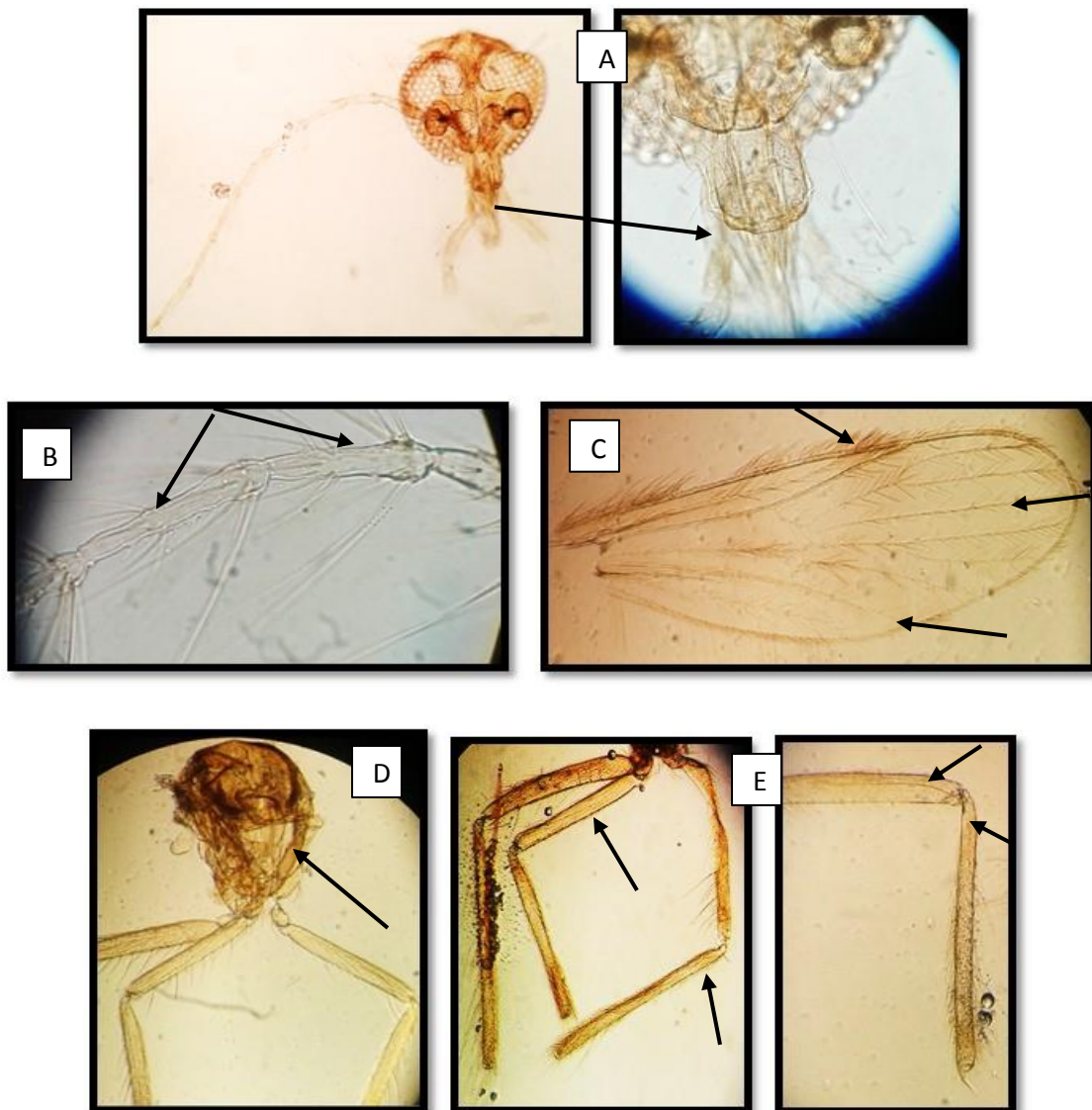


Figura 16 Características distintivas de *C. puella*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco, en las localidades de Villa Luz, Tacotalpa y Chimalapa 2^a, Huimanguillo.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI7309.

4.6 *Corethrella quadrivittata* Shannon y Del Ponte

Corethrella quadrivittata Shannon y Del Ponte, 1928

Corethrella kummi Lane, 1942

Corethrella dyari Lane, 1942

Corethrella izquierdoi Vargas, 1952

Localidad tipo: Tres Pozos, cerca de Embarcación, Salta, Argentina.

Diagnosis: Ala con cuatro bandas transversales (la última sin escamas oscuras y se extienden hasta el ápice del ala) (Fig. 17-A); halterio café oscuro y tibia posterior con pigmentación oscura en la sección basal y apical (Fig. 17-B, C).

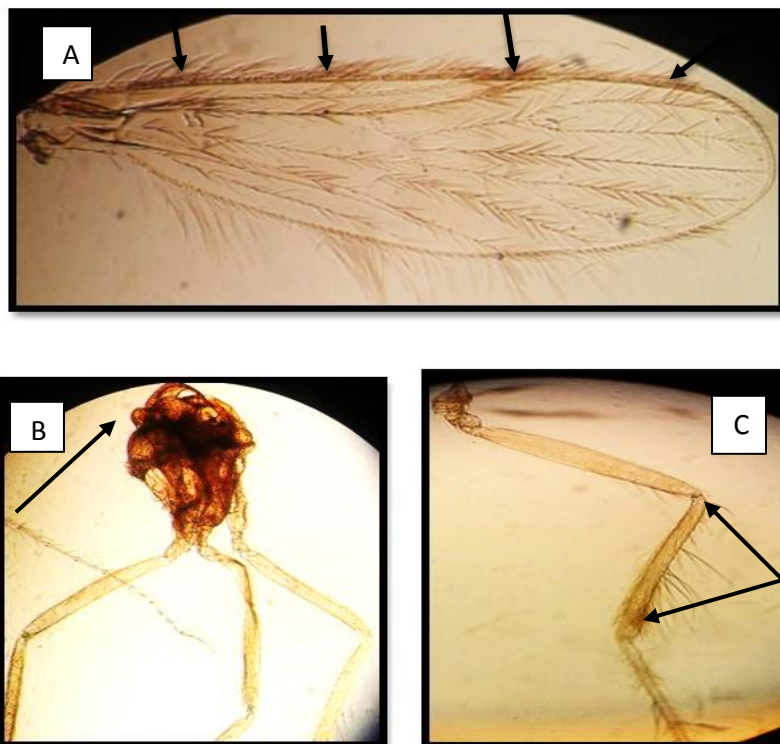


Figura 17 Características distintivas de *C. quadrivittata*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en las localidades de Cárdenas 1era Sección y Zona Arqueológica de Comalcalco.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI8208.

4.7 *Corethrella squamifemora* Borkent

Localidad tipo: El Tuito, Jalisco, México.

Diagnosis: Ala con una banda trasnversal media distintiva, con o sin más escamas oscuras basales en C, Sc y M (Fig. 18-A); tórax café oscuro (fig. 18-B), fémur medio café oscuro, base de la tibia posterior oscuro (con el ápice del fémur posterior pálido), base del fémur posterior oscuro 0.58-0.67 (Fig.18-C) y todos los fémures con escamas delgadas (Fig. 18-D).

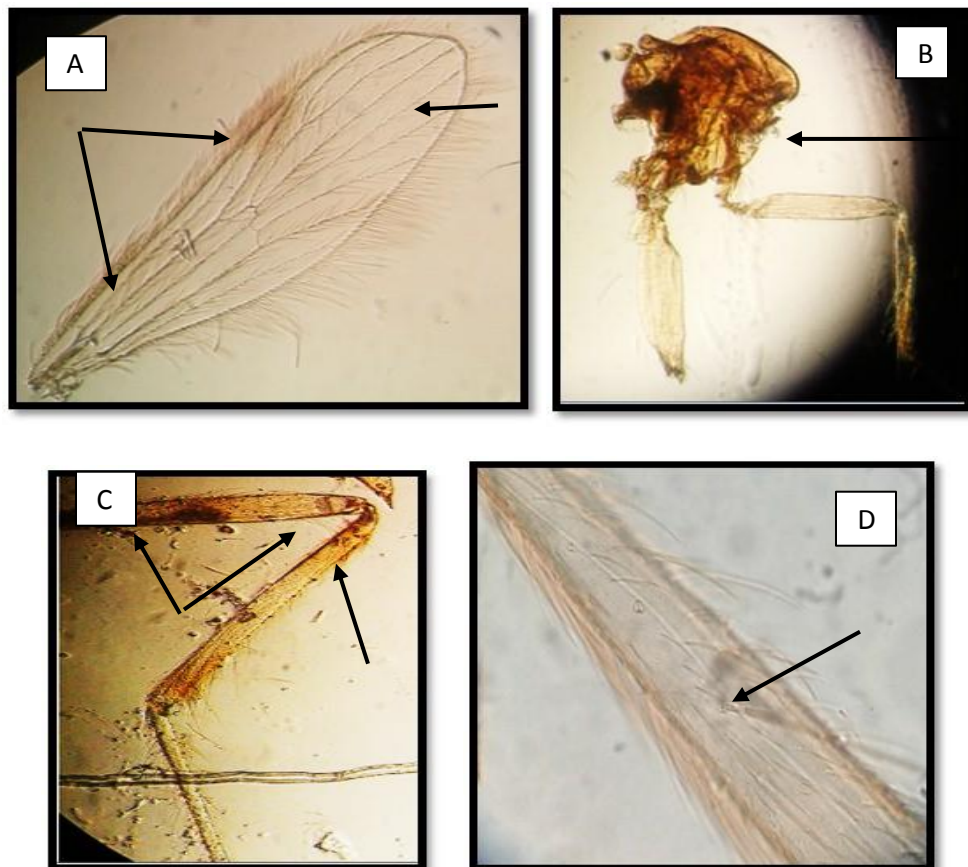


Figura 18 Características distintivas de *C.squamifemora*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en la localidad de Pantanos de Centla (Centro de Referencia), Centla.

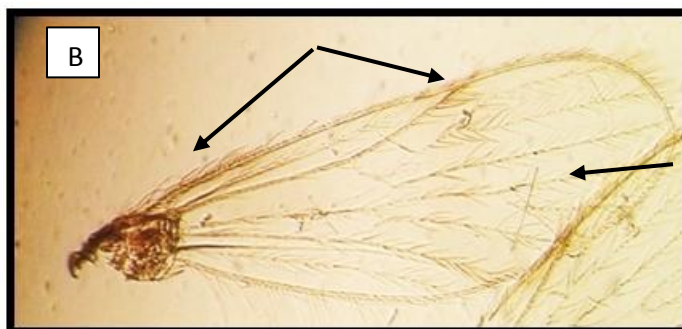
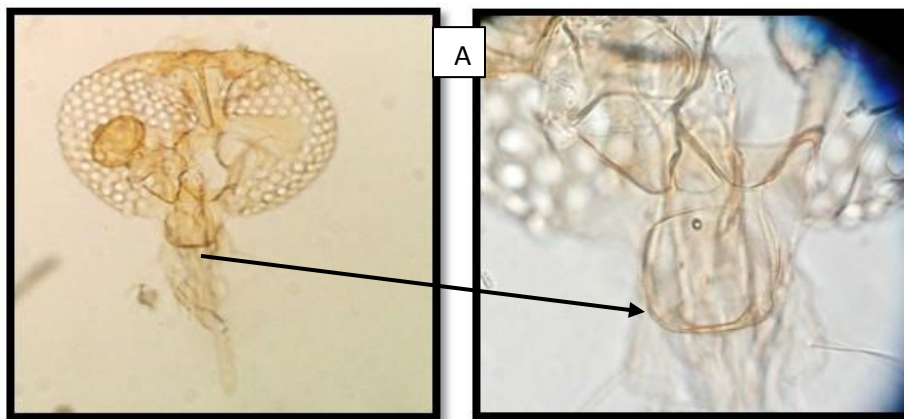
Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI7712.

4.8 *Corethrella selvicola* Lane

Corethrella selvicola Lane, 1939

Localidad tipo: Juquiá, São Paulo, Brasil.

Diagnosis: Clípeo ancho (Fig. 19-A); flagelómeros 1-3 moderadamente alargados; ala con bandas transversales media y basales distintivas, algunas escamas oscuras en C, Sc y M (Fig. 19-B); tórax café oscuro (Fig. 19-C); halterio pálido (mucho más claro que el escutelo); sección media del fémur café oscuro igual a la base del fémur posterior, base de la tibia posterior oscura que contrasta con el ápice del fémur posterior pálido (Fig. 19-D); mitad del fémur posterior sin escamas (Fig. 19-E).



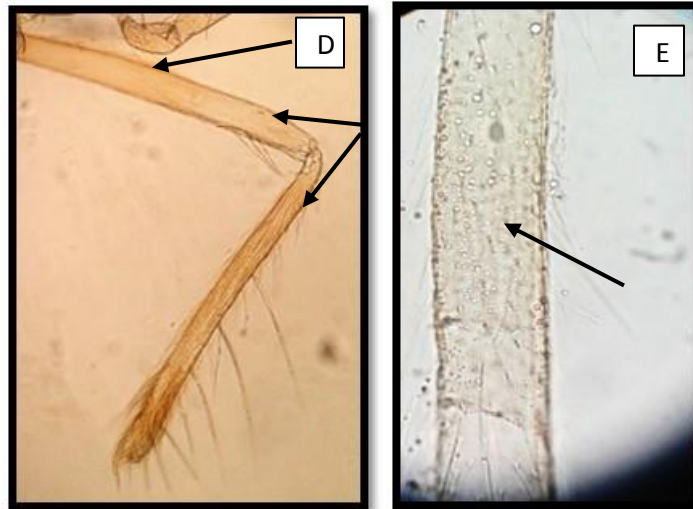


Figura 19 Características distintivas de *C. selvicola*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en las localidades de Villa Luz, Tacotalpa y Niños Héroes, Tenosique.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI5565.

4.9 *Corethrella vittata* Lane

Corethrella vittata Lane, 1939

Corethrella tripunctata Lane, 1942

Localidad tipo: Juquiá, São Paulo, Brasil.

Diagnosis: Posee una banda subapical en el ala (sin escamas oscuras en las venas que se extienden hasta el ápice del ala) (Fig. 20-A); base de la tibia posterior pálida y ápice de la tibia posterior oscura (Fig. 20-B, C).



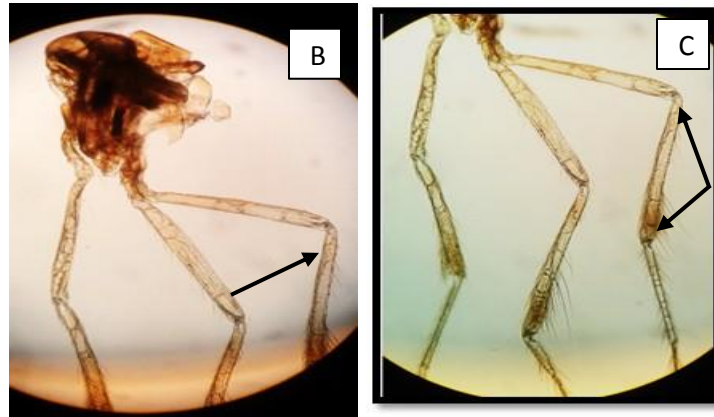


Figura 20 Características distintivas de *C. vittata*

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en la localidad de Cárdenas 1era Sección, Comalcalco.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI9178

4.10 *Corethrella* sp. 1

Diagnosis: Cabeza de color café claro, pequeña y redonda (Fig. 21-A); tórax café oscuro (Fig. 21-B); abdomen con escamas de color café claro dispersas en cada segmento (Fig. 21-C).

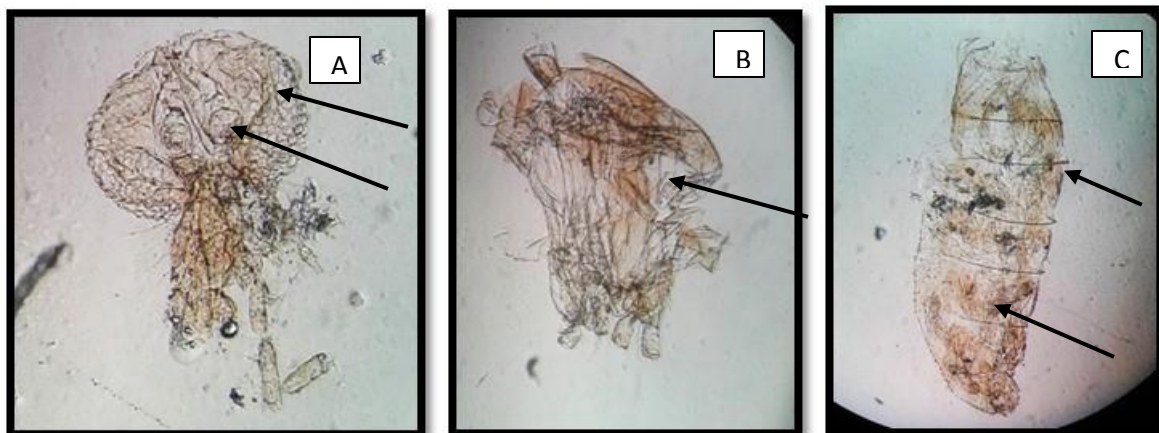


Figura 21 Características distintiva de *Corethrella*. sp.1

Estructuras que faltan: Alas, patas y antenas.

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de San Luis Potosí en la localidad de Puerto de Mamey, Aquismón.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADJ3958.

4.11 *Corethrella* sp. 2

Diagnosis: Tórax café claro (Fig. 22-A); el ápice del fémur posterior café oscuro, la tibia café pálido (Fig. 22-B); abdomen café claro, con banda longitudinal café oscuro (Fig. 22-C).

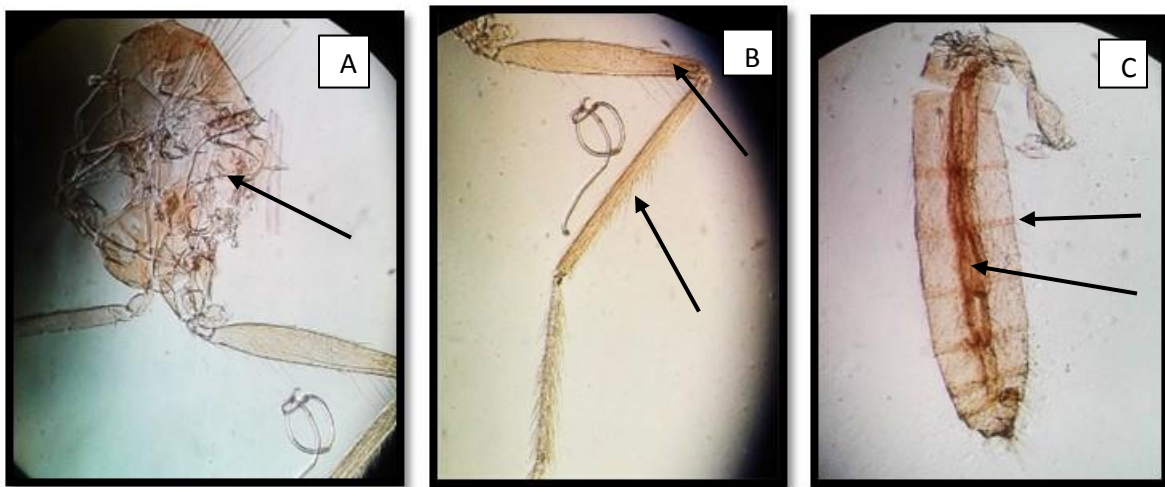


Figura 22 Características distintivas de *Corethrella* sp. 2

Estructuras que faltan: Alas y cabeza.

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de San Luis Potosí en la localidad de Puerto de Mamey, Aquismón.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADJ1057.

4.12 *Corethrella* sp. 3

Diagnosis: Cabeza de color café oscuro, pequeña y redonda (Fig. 23-A); tórax café oscuro (Fig. 23-B); fémur posterior café oscuro, la tibia posterior café pálido (Fig. 23-C); abdomen café oscuro (Fig. 23-D).

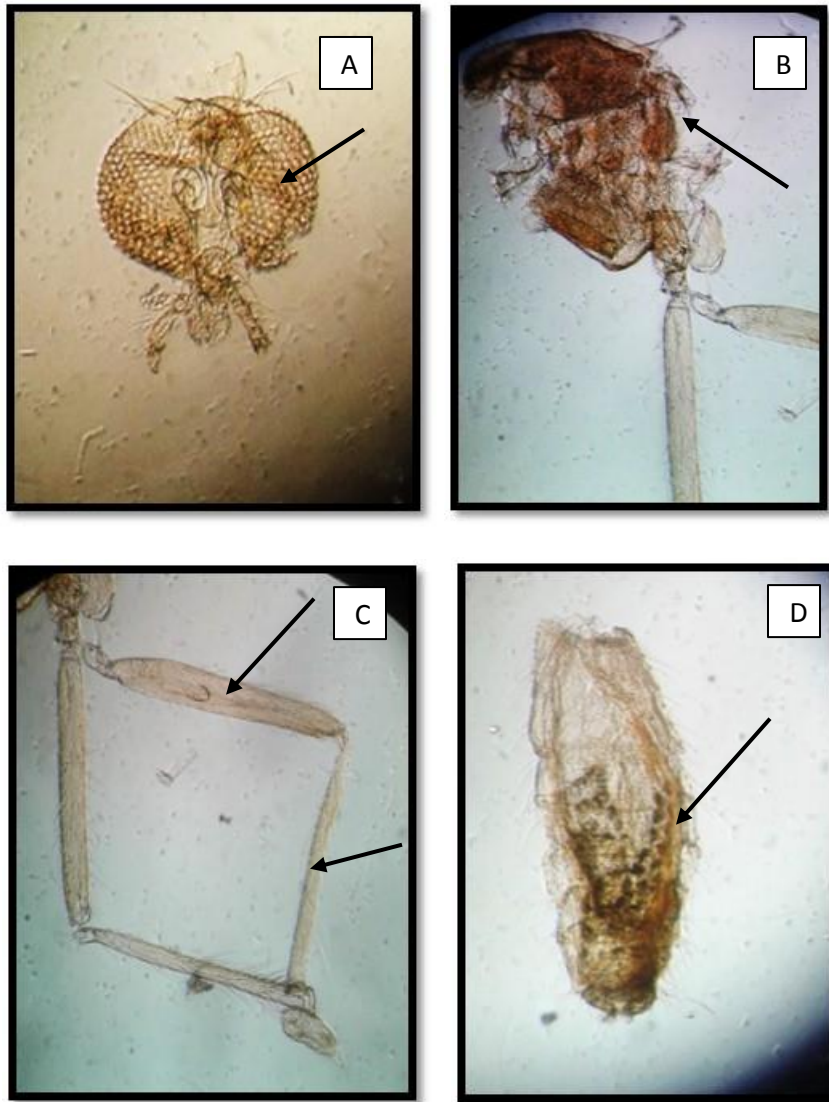


Figura 23 Características distintivas de *Corethrella* sp. 3

Estructuras que faltan: Alas, patas y antenas.

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el Estado de Tabasco, en la localidad de Chontalpa, Huimanguillo.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADJ1889.

4.13 *Corethrella* n. sp. 1

Diagnosis: Cabeza pequeña y redonda de color café oscuro (Fig. 24-A); ala con banda transversal media distintiva, con escamas oscuras en la base de la vena C, Sc y M (Fig. 24-B); tórax café oscuro (Fig. 24-C); pata posterior con la base de la tibia ligeramente oscura, con el fémur posterior pálido (Fig. 24-D); abdomen café oscuro (Fig. 24-C).

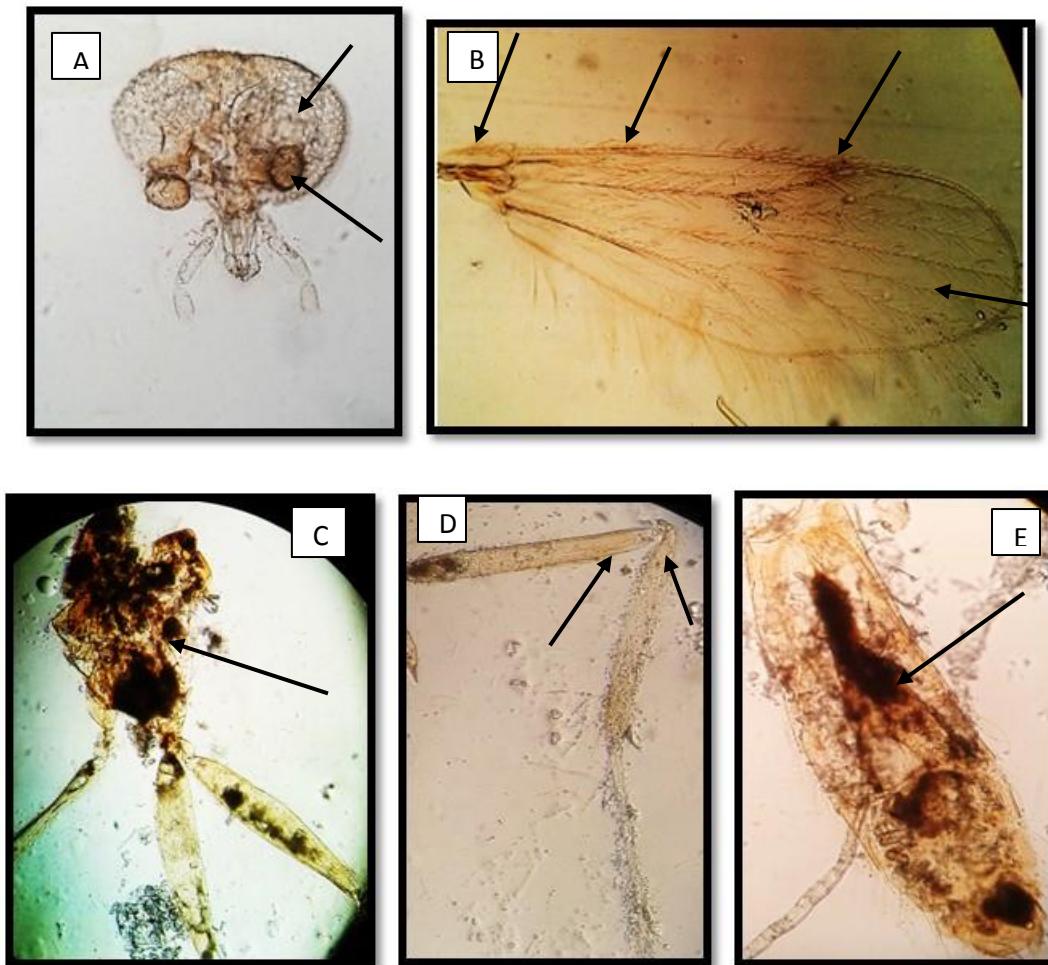


Figura 24 Características distintivas de *Corethrella* n. sp. 1

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de San Luis Potosí en la localidad de San Isidro Tampaxal, Aquismón.

Numero Binario de identificación: BOLD: ADI8036.

4.14 *Corethrella* n. sp. 2

Diagnosis: Cabeza pequeña de color café oscuro (Fig. 25-A); ala con cuatro bandas transversales oscuras (Fig. 25-B); tórax café oscuro (Fig. 25-C); base de la tibia posterior pálida, el ápice de la tibia posterior ligeramente oscura (Fig. 25-D); abdomen café oscuro (Fig. 25-E).

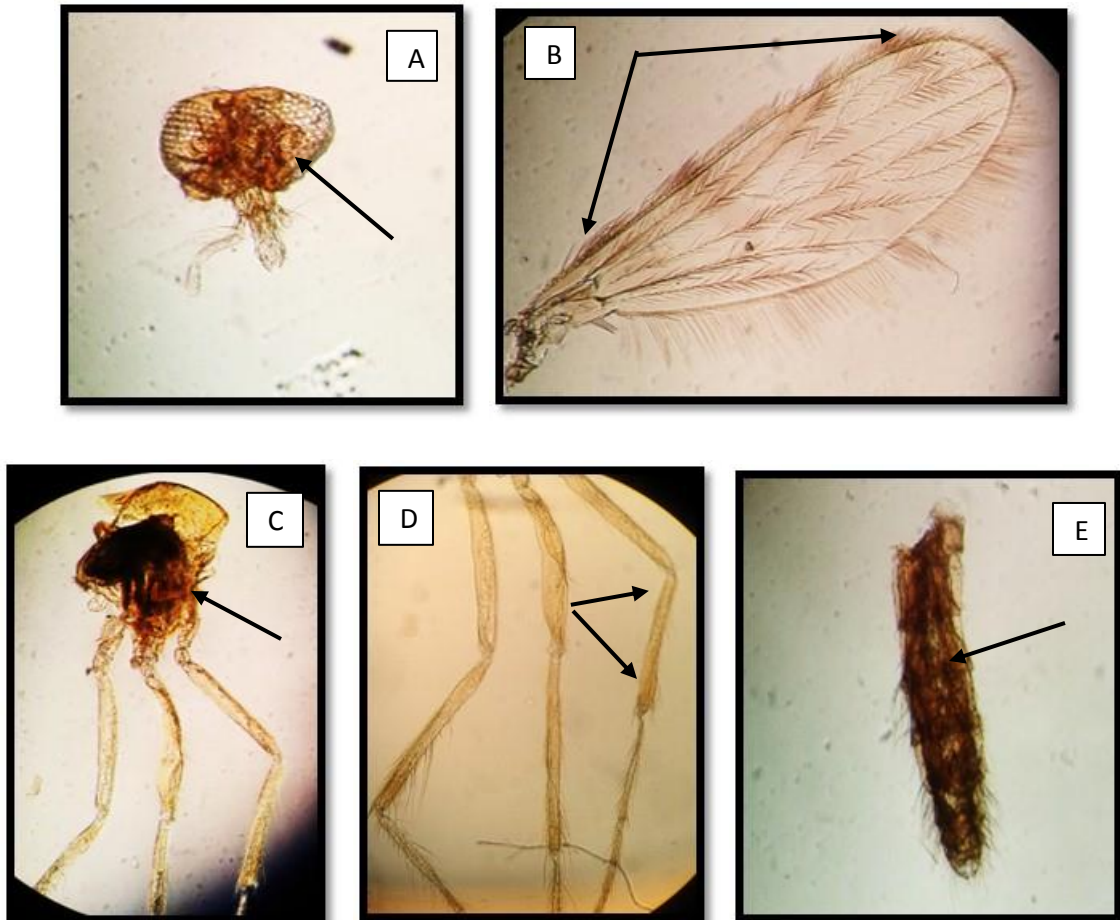


Figura 25 Características distintivas de *Corethrella* n. sp. 2

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en la localidad de Cárdenas 1era Sección, Comalcalco y Pantanos de Centla (Centros de Referencia), Centla.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI6344.

4.15 *Corethrella* n. sp. 3

Diagnosis: Cabeza pequeña y redonda de color café oscuro, con antenas café claro (Fig. 26-A); ala con bandas oscuras en las venas Sc, M y subapical, sin banda basal (Fig. 26-B); tórax café oscuro (Fig. 26-C); base de la tibia posterior pálida, el ápice de la tibia posterior ligeramente oscura (Fig. 26-D); abdomen café oscuro (Fig. 26-E).

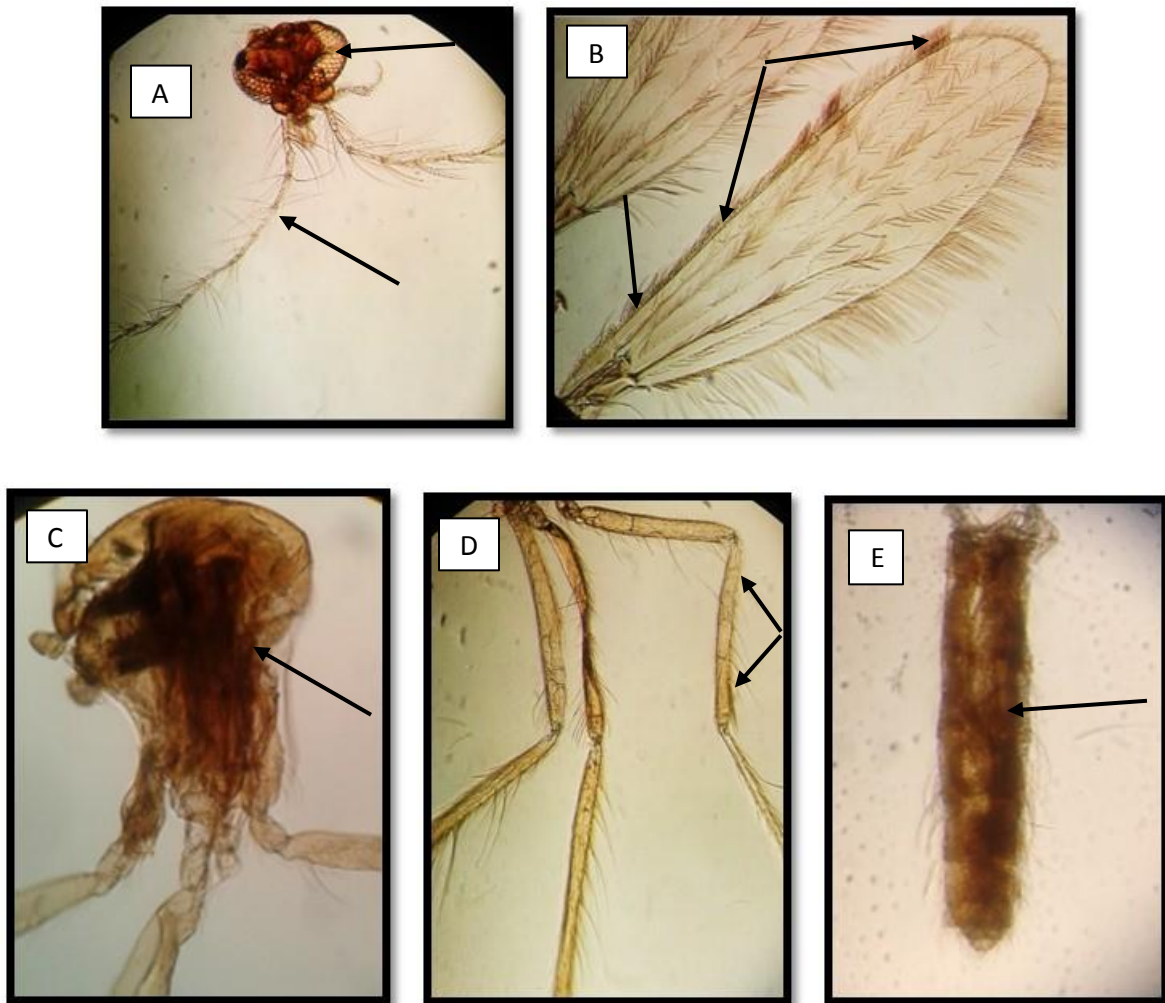


Figura 26 Características distintivas de *Corethrella* n. sp. 3

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en las localidades de Cárdenas 1era Sección, Comalcalco y Chimalapa 2ª, Huimanguillo.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADI7310

4.16 *Corethrella* n. sp. 4

Diagnosis: Cabeza redonda de color café claro, con el clipeo muy alargado (Fig. 27-A); ala con escamas muy delgadas, con dos bandas transversales oscuras (Fig. 27-B); tórax café claro (Fig. 27-C); patas moteadas café claro (Fig. 27-D); abdomen café claro (Fig. 27-E).

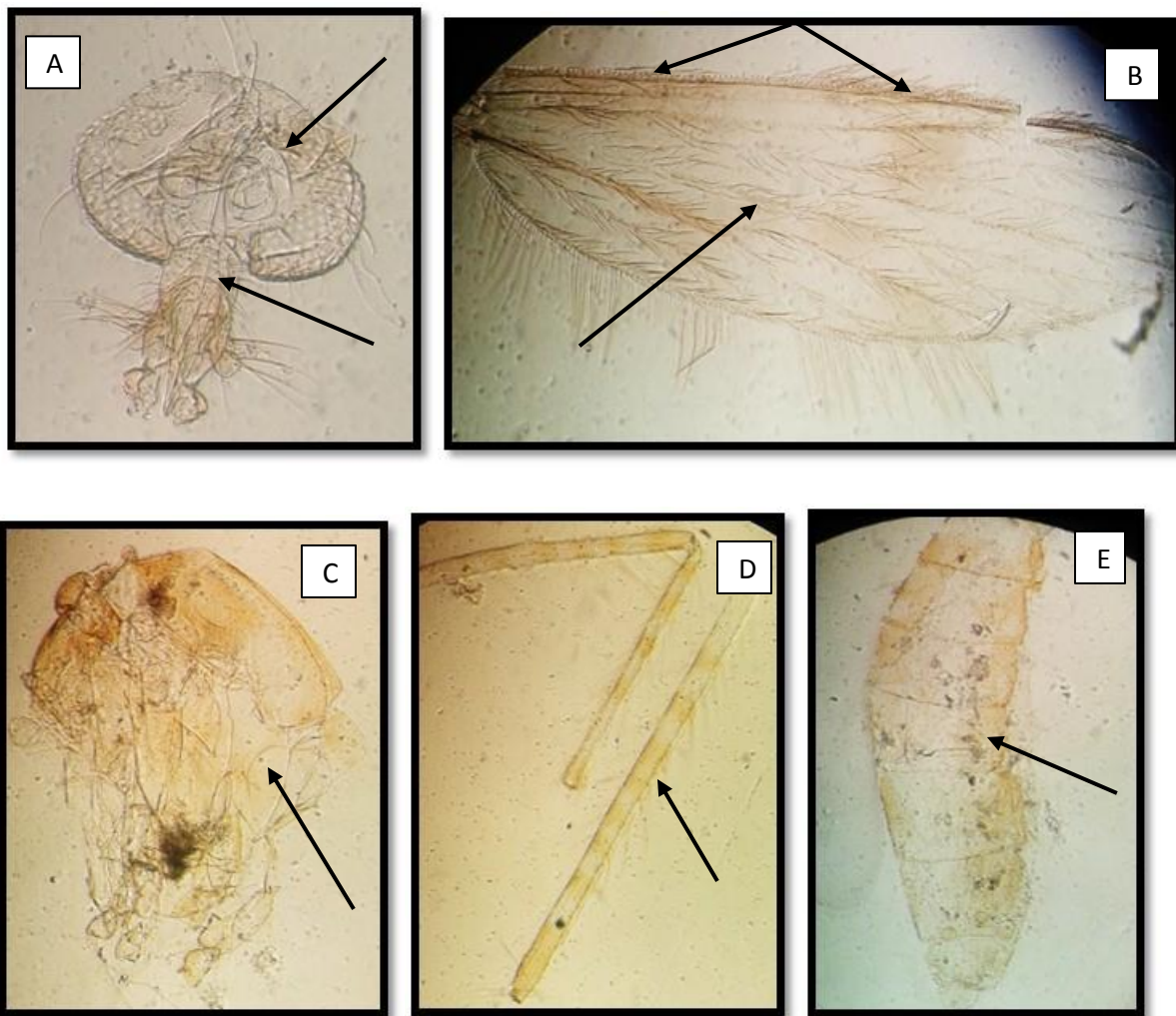


Figura 27 Características distintivas de *Corethrella* n. sp. 4

Localidad de colecta: Esta especie fue colectada en el estado de Tabasco en las localidades de Pantanos de Centla (Centros de Referencia), Centla y Niños Héroes, Tenosique.

Numero Binario de Identificación: BOLD: ADJ1531.

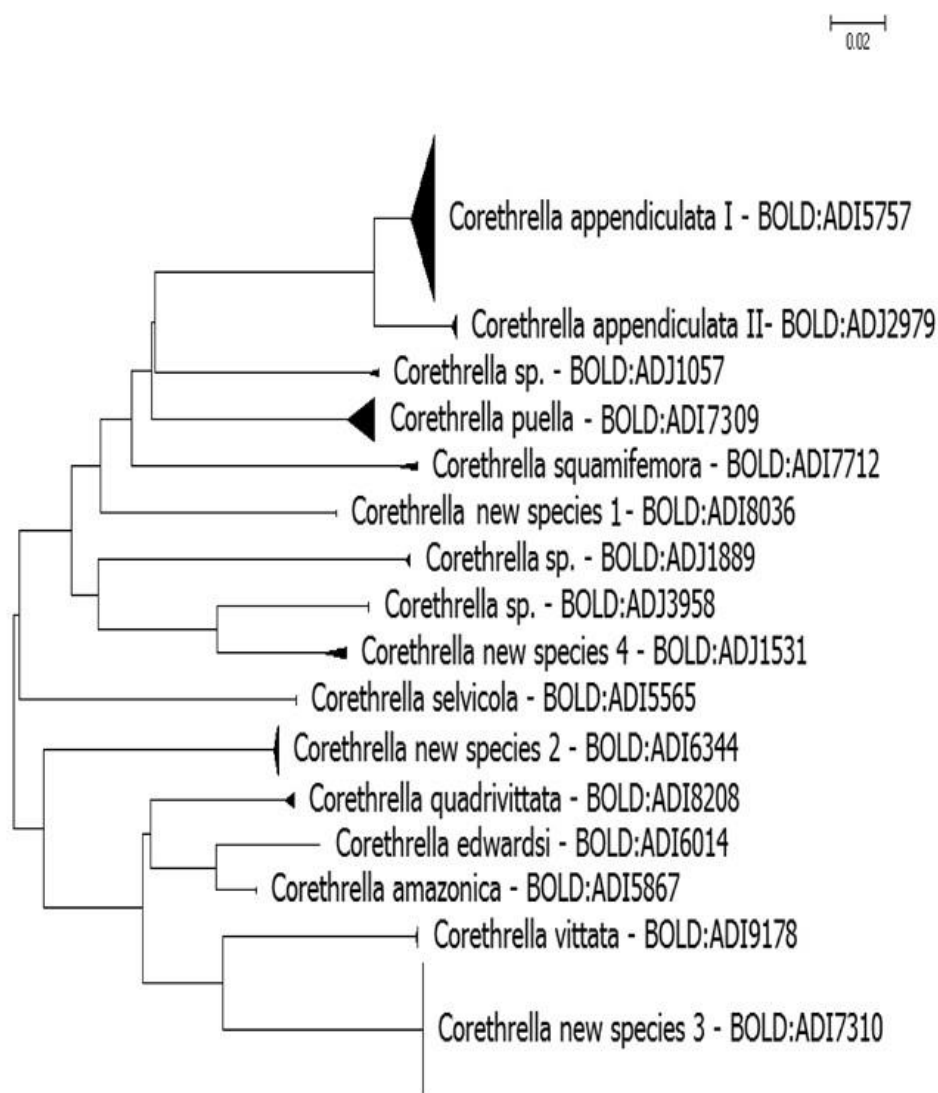


Figura 28 Neighbor Joining de las especies de *Corethrella*, incluyendo el número binario de identificación para cada especie

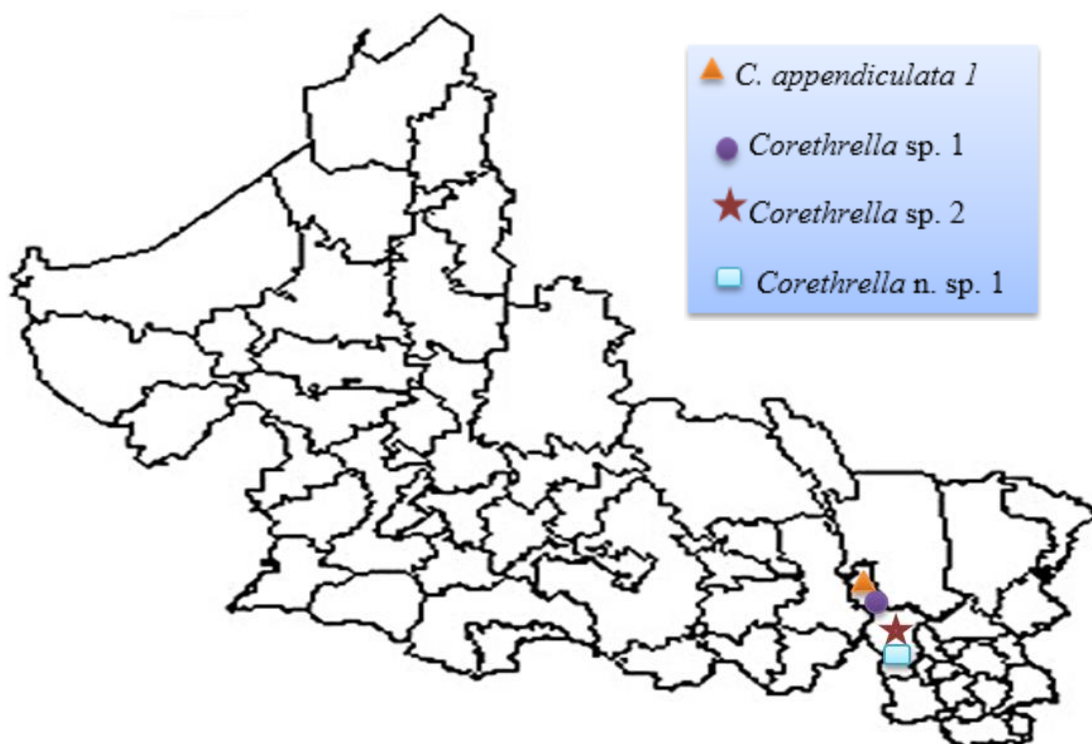


Figura 29 Distribución de especies de Corethrellidae en el estado de San Luis Potosí, México

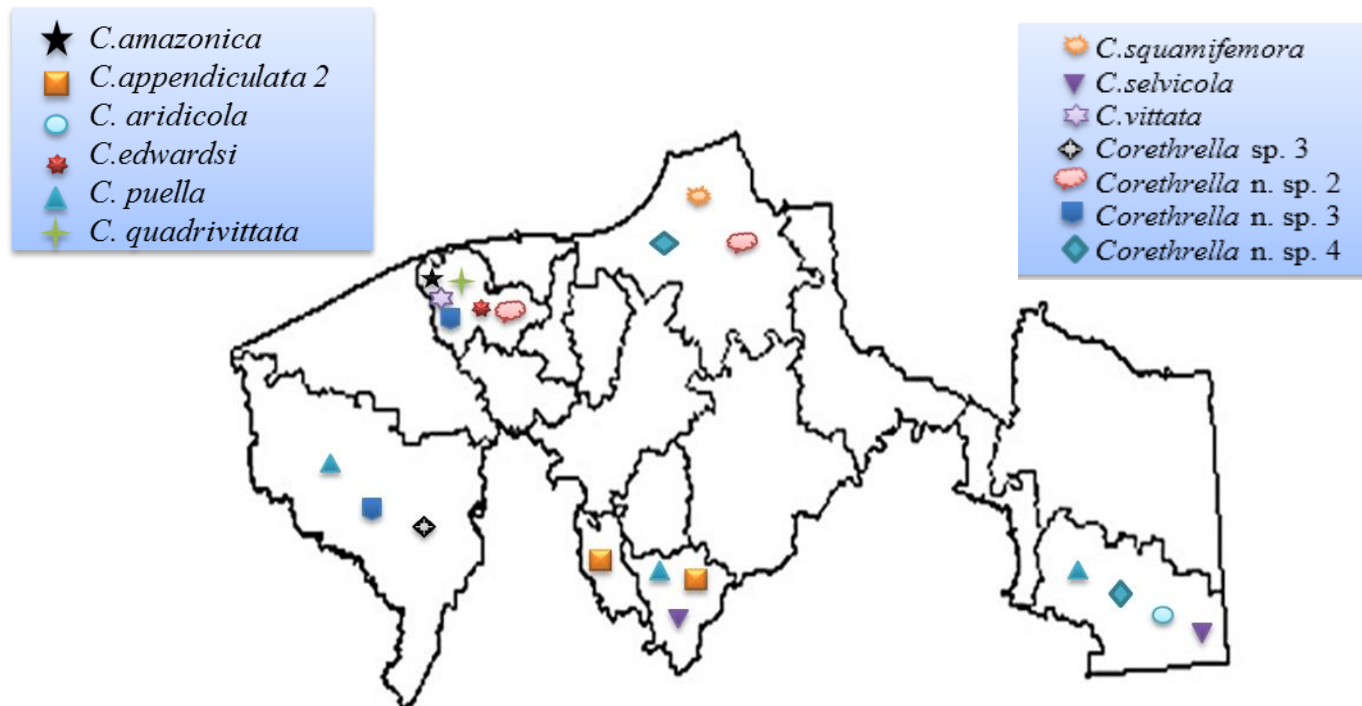


Figura 30 Distribución de especies de Corethrellidae en el estado de Tabasco, México

V. DISCUSIONES

En la presente investigación se estudiaron un total de 196 mosquitas picadoras de ranas provenientes de los estados de San Luis Potosí y Tabasco, los especímenes estudiados se clasificaron en cinco grupos curatoriales:

Grupo 1: Especímen identificado con Número Binario de Identificación

Grupo 2: Especímen no identificado con Número Binario de Identificación

Grupo 3: Especímen identificado como nueva especie con Número Binario de Identificación

Grupo 4: Especímen identificado sin Número Binario de Identificación

Grupo 5: Especímen no identificado sin Número Binario de Identificación

Los especímenes del grupo 1 fueron los que se identificaron a nivel especie y además se obtuvo una secuencia genómica de Citocromo Oxidasa sub unidad 1, así como su BIN (n=76: *C. amazonica*, *C. appendiculata* 1 y 2, *C. edwardsi*, *C. puella*, *C. quadrivittata*, *C. squamifemora*, *C. selvicola* y *C. vittata*); los especímenes del grupo 2 son los que no fueron identificados por la ausencia de estructuras diagnósticas necesarias para determinar la identidad específica, pero en los cuales se obtuvo BIN (n=7: *Corethrella*. sp. 1, *Corethrella*. sp. 2 y *Corethrella*. sp. 3); los especímenes del grupo 3 son aquellos declarados como nuevas especies, todos estos poseen BINS (n=56: *Corethrella* n. sp. 1, *Corethrella* n. sp. 2, *Corethrella* n. sp. 3 y *Corethrella* n. sp. 4); el espécimen del grupo 4 fue identificado, pero no se obtuvo BIN (n=1: *C. aridicola*); los especímenes del grupo 5 no fueron identificados por la ausencia de estructuras diagnósticas necesarias para determinar la identidad específica y tampoco se obtuvo BIN (n=56).

Los grupos curatoriales 2 y 3 son hasta cierto punto parecidos, éstos no fueron identificados, aunque si se obtuvieron BINS; el grupo 2 corresponde a especies cuyo BIN no coincidió con ningún otro de esta investigación, tampoco con ningún BIN encontrado en bases de datos de secuencias genómicas disponibles en internet como GenBank y/o BOLD systems®, por lo que fueron declarados como nuevos BINS. Aunque todos los BINS de este estudio fueron nuevos, esto no significa que todas las especies sean nuevas, por ejemplo, todas las especies comprendidas en el grupo 1 fueron identificadas a nivel especie, no obstante, en cada una de estas especies se obtuvo un BIN nuevo, aunque la especie no lo era. En el grupo 2 se colocaron las especies cuyos BINS fueron diferentes al no coincidir con ningún otro, sin embargo, no pudieron identificarse morfológicamente debido a la pérdida de estructuras diagnósticas necesarias para su identificación, como antenas, alas, patas, entre otras (*Corethrella* sp.1, *Corethrella* sp. 2 y *Corethrella* sp. 3). Al no tener la certeza de la identidad específica de este grupo, no fue posible decidir si en este grupo se incluyen especies conocidas y diferentes a las reportadas en el grupo 1 (*C. fulva* Lane, *C. incompta* Borkent, *C. ranapungens* Borkent y/o *C. warthoni* Vargas, las cuales han sido previamente reportadas en México); tampoco fue posible decidir si estos especímenes corresponden a nuevas especies. En el grupo 3 se incluyen las especies con BINS distintos al resto, pero que si conservaron todas sus estructuras diagnósticas, las identidades de estas especies fueron inconsistentes con todas las especies de *Corethrella* de América, por lo que fueron declaradas como nuevas especies:

Corethrella n. sp. 1: Especie cercana a *C. squamifemora*, las alas de ambas especies poseen una banda transversal media distintiva; tórax y abdomen café oscuro. La característica distintiva con *C. squamifemura* es que ésta posee la base del femur posterior oscuro, mientras que *C. n. sp. 1* la base del femur posterior es claro. Estas especies están cercanas en el cladograma (Fig. 28), siendo ambas cercanas filogenéticamente.

Corethrella n. sp. 2: Especie cercana a *C. vittata*, las alas de ambas especies poseen cuatro bandas transversales de escamas oscuras y la base de la tibia posterior es pálida. La característica distintiva con *C. vittata* es que ésta posee el ápice de la tibia posterior fuertemente oscura, mientras que en *C. n. sp. 2* el ápice de la tibia posterior es ligeramente oscura.

Corethrella n. sp. 3: Especie cercana a *C. vittata*, en ambas especies la base de la tibia posterior es pálida y el ápice de la tibia posterior es fuertemente oscura. La característica distintiva con *C. vittata* es que ésta posee en el ala cuatro bandas transversales (banda basal, sub-basal, media, sub-apical), mientras que *Corethrella* n.sp.3 posee todas las bandas excepto la banda basal. Estas especies están cercanas en el cladograma (Fig. 28), siendo ambas cercanas filogenéticamente.

Corethrella n. sp. 4: Especie muy distinta al resto, no se encontraron similitudes morfométricas con otras especies conocidas de *Corethrella*. Ésta especie es la única en América con escamas en el ala muy delgadas, patas moteadas y clípeo muy alargado. En el cladograma ésta especie aparece cercana a *Corethrella* sp.1 (Fig. 28).

Las especies de Corethrellidae y el estado en donde fueron encontradas se mencionan a continuación:

San Luis Potosí: *Corethrella appendiculata* 1, *Corethrella* sp. 1, *Corethrella* sp. 2 y *Corethrella* n. sp. 1.

Tabasco: *C. amazonica*, *C. appendiculata* 2, *C. aridicola*, *C. edwardsi*, *C. puella*, *C. quadrivittata*, *C. squamifemora*, *C. selvicola*, *C. vittata*, *Corethrella* sp. 3, *Corethrella* n. sp. 2, *Corethrella* n. sp. 3 y *Corethrella* n. sp. 4.

En ambos estados se colectaron 16 especies, de las cuales se lograron identificar nueve, tres especies no fueron identificadas y cuatro especies resultaron ser nuevas para la ciencia.

La especie mas frecuentes fueron *C. appendiculata* 1 (n=41), *Corethrella* n. sp. 3 (n=37), *Corethrella* n. sp. 2 (n=14), *C. puella* (n=11), *C. appendiculata* 2 (n=6), *C. vittata* (n=6), *C. quadrivittata* (n=4); mientras que las menos frecuentes fueron *C. selvicola* (n=3), *Corethrella* sp. 1 (n=3), *Corethrella* n. sp. 4 (n=3), *C. squamifemora* (n=2), *Corethrella* sp. 2 (n=2), *Corethrella* sp. 3 (n=2), *Corethrella* n. sp. 1 (n=2), *C. amazonica* (n=2), *C. edwardsi* (n=1), *C. aridicola* (n=1).

Se reporta la presencia de *C. appendiculata* 1 y 2, (la 1 corresponde al estado de San Luis Potosí, mientras que la 2 corresponde al estado de Tabasco), la especie es dividida en dos grupos porque aunque no se encontraron diferencias morfométricas entre ambas poblaciones, los BINS fueron diferentes, sugiriendo divergencia genética entre ambas poblaciones. Considerando que *C. appendiculata* es la especie de Corethrellidae con mayor rango de distribución en América (desde Argentina hasta el sur de Estados Unidos de América, además de algunas islas del Caribe), se postula la hipótesis de que *C. appendiculata* es en realidad un complejo

de especies cuyas poblaciones en México, se distribuyen de manera alopátrica. Por lo que se recomienda que se utilice el término (*sensu lato*): “*Corethrella appendiculata s.l.*”

Los nuevos registros estatales son: *C. amazonica*, *C. squamifemora* y *C. selvicola* para Tabasco, mientras que los nuevos registros nacionales para México son: *C. edwardsi*, la cual es conocida para Brasil, Colombia, Costa Rica, Guayana y México (presente estudio) y *C. vittata*, la cual es conocida para Brasil, Guayana, Puerto Rico y México (presente estudio).

Borkent (2008) menciona que en México existen 11 especies de *Corethrella*: *C. amazonica*, *C. fulva*, *C. squamifemora*, *C. appendiculata*, *C. quadrivittata*, *C. ranapungens*, *C. puella*, *C. aridicola*, *C. selvicola*, *C. incompta* y *C. whartoni*. En el presente estudio se reporta la presencia de todas las especies reportadas por este autor a excepción de *C. fulva*, *C. ranapungens*, *C. incompta* y *C. whartoni*.

En Texas, Bernal *et al.*, (2006) reportaron siete especies de *Corethrella* colectadas con trampas CDC y con sonido de canto de ranas: *C. blanda* Dyar, *C. edwardsi*, *C. peruviana* Lane, *C. puella*, *C. quadrivittata*, *Corethrella* n. sp. 1 y *Corethrella* n. sp. 2. En la presente investigación se reporta la presencia de tres de estas especies (*C. edwardsi*, *C. puella* y *C. quadrivittata*) desconociendo si la identidad de las nuevas especies son conespecíficas con las nuevas especies aquí reportadas.

En Nueva York, De Silva *et al.*, (2013), reportaron diez especies de *Corethrella* colectadas con trampas CDC y con sonido de canto de ranas: *C. bicolor* Borkent, *C. brevivena* Borkent, *C. carariensis* Borkent, *C. davisii* Shannon, *C. douglasi* Borkent, *C. edwardsi*, *C. flavitibia* Lane, *C. globosa* Borkent, *C. gloma* Borkent, *C. longituba*

Belkin, *C. manaosensis* Lane y Cerqueira, *C. quadrivittata* y *C. travassosi* Lane. En la presente investigación se reporta la presencia de *C. edwardsi* y *C. quadrivittata* en común con este estudio.

En Gamboa, Panamá, Bernal y de Silva (2015) reportaron siete especies de *Corethrella* colectadas con trampas CDC, cebadas con Dióxido de Carbono y sonido de canto de ranas: *C. gloma*, *C. longituba*, *C. peruviana*, *C. quadrivittata*, *C. squamifemora*, *Corethrella* n. sp 1 y *C. n. sp 2*. Comparado con este estudio, en la presente investigación se reportan la presencia de *C. quadrivittata* y *C. squamifemora*, desconociendo si las identidades de las dos nuevas especies son conespecíficas con las aquí reportadas.

La técnica del código de barras de la vida (barcode of life) empleando el gen Citocromo Oxidasa subunidad 1 (COI) fue usado en esta investigación con resultados favorables. Esta técnica es altamente recomendada para estudios de taxonomía de Corethrellidae, logrando corroborar en la mayoría de los casos las identidades específicas de los BINS. El COI es un gen mitocondrial con suficiente divergencia genética como para discriminar especies de la familia Corethrellidae, posiblemente también sea importante para discriminar grupos de especies o complejos como en el caso de *C. appendiculata* s.l. y *C. vittata* + *Corethrella* n. sp. 2 + *Corethrella* n. sp. 3. Futuras investigaciones serán necesarias para determinar si *C. vittata* también representa un complejo de especies.

Considerando que las hembras de la familia Corethrellidae se alimentan exclusivamente de la sangre de las ranas macho, la importancia médica que poseen como vectores de enfermedades queda restringida solo para las ranas macho. Este grupo de insectos no posee importancia médica para los humanos, ni para los

animales domésticos. No obstante, las ranas representan uno de los grupos de animales más importantes para los ecosistemas en donde ellas habitan, siendo piezas clave de muchas cadenas tróficas, ofreciendo distintos servicios ambientales como agentes importantes de control biológico de insectos plaga y algunas especies han sido utilizadas como elementos importantes en el tratamiento de enfermedades virales en humanos.

VI. CONCLUSIONES

En la presente investigación se logró contribuir al conocimiento de la taxonomía de la familia Corethrellidae en México, logrando identificar nueve especies (*C. amazonica*, *C. appendiculata*, *C. aridicola*, *C. edwardsi*, *C. puella*, *C. quadrivittata*, *C. selvicola*, *C. squamifemora* y *C. vittata*), de las cuales *C. amazonica*, *C. aridicola*, *C. selvicola* y *C. squamifemora* son nuevos registros estatales para Tabasco; *C. edwardsi* y *C. vittata* son nuevos registros nacionales para México. Tres especies no pudieron ser identificadas, mientras que cuatro especies resultaron ser nuevas para la ciencia. Los 16 Números Binarios de Identificación (BINS) mostrados en el cladograma (Fig. 28) resultaron ser nuevos BINS, lo que contribuirá a futuros estudios de taxonomía molecular de la familia Corethrellidae.

La falta de BINS en bases de datos taxonómicas se debe a la pobreza de estudios de taxonomía molecular de la familia Corethrellidae en el mundo, por lo que se recomienda continuar con este tema de investigación para conocer más sobre la taxonomía de estos insectos.

Los estudios taxonómicos que involucran técnicas morfométricas y moleculares para conocer la riqueza de seres vivos y la biodiversidad es impredecible en cualquier país. México es un país megadiverso, el cual alberga cerca del 10% de la biodiversidad del mundo. A nivel mundial México ocupa el quinto lugar en mayor número de especies de plantas, cuarto en anfibios, segundo en mamíferos y primero en reptiles. En total, en México existen más de 108,000 especies vivientes, de las cuales 65,000 son invertebrados y la mayoría de éstas son insectos. No obstante, existen grupos poco estudiados o desconocidos como las mosquitas picadoras de ranas. Se recomienda continuar con esta línea de investigación en otros estados de

México para conocer la riqueza de Corethrellidae que existe en México, así como incluir otros estados de vida como larvas y pupas, los cuales ofrecen características diagnósticas útiles para la identificación.

En la colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, se encontraron especies de Corethrellidae que no habían sido reportadas en México y que son registradas en la presente investigación (*C. edwardsi* y *C. vittata*), por lo que la hipótesis antes planteada es aceptada.

El presente estudio representa la primera investigación sistemática de taxonomía morfométrica y molecular de la familia Corethrellidae en el mundo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amaral, A. P., y Pinho L. C. 2015. New species and records of frog-biting midges from southern Brazil (Diptera: Corethrellidae). *Zootaxa*. 3946 (2): 274-284.
- Bernal, X. E., Rand, A. S., and Ryan, M. J. 2006. Acoustic preferences and localization performance of blood-sucking flies (*Corethrella* Coquillett) to túngara frog calls. *Behavioral Ecology*. 17(5): 709-715.
- Batovska, J., Blacket, M. J., Brown, K., y Lynch, S. E. 2016. Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*. 6 (9): 3001-3011.
- Barcode of Life Data System (BOLD) 2014-2018. Advancing Species Identification and Discovery. <http://www.barcodingoflife.org>.
- Bernal, X. E., y de Silva, P. 2015. Cues used in host-seeking behavior by frog-biting midges (*Corethrella* spp. Coquillett). *Journal of Vector Ecology*. 40 (1): 122-128.
- Belkin, J.N. y McDonald, W.A. 1955. A population of *Corethrella laneana* from Death Valley, with descriptions of all stages and discussion of the Corethrellini (Diptera, Culicidae). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*. 54 (2): 82-96.
- Borkent A. 2008. The Frog-Biting Miges of the world (Corethrellidae: Diptera). *Zootaxa* 1804 Nuw Zealand. pp. 1-456.
- Borkent A. 2012. Insecta: (Diptera: Corethrellidae). Freshwater invertebrates of the Malaysian region. pp. 638-640.
- Borkent, A. y Grafe, T. U. 2012. The frog-biting midges of Borneo from two to eleven species (Corethrellidae: Diptera). *Zootaxa*. 3279 (1): 1-45.
- Borkent, A. y Spinelli, G. R. 2007. Neotropical Ceratopogonidae (Diptera:Insecta): Ceratopogonidae Neotropicales (Diptera, Insecta) Vol. 4. Pensoft Publishers. pp. 1-94

- Camp, J. V. 2006. Host attraction and host selection in the family Corethrellidae (Wood and Borkent) (Diptera). Electronic theses and dissertations. Georgia Southern University. pp. 1-76.
- Chan, A., Chiang, L. P., Hapuarachchi, H. C., Tan, C. H., Pang, S. C., Lee, R., y Lam-Phua, S. G. 2014. DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites y vector*. 7(1): 569.
- De Silva, P. D., y Bernal, X. E. 2013. First report of the mating behavior of a species of frog-biting midge (Diptera: Corethrellidae). *Florida entomologist*. 96(4): 1522-1529.
- De Silva, P., Jaramillo, C., and Bernal, X. E. 2014. Feeding site selection by frog-biting midges (Diptera: Corethrellidae) on anuran hosts. *Journal of insect behavior*. 27(3): 302-316.
- De Silva, P., Miranda, R., y Bernal, X. E. 2015. First report of mite parasitization in frog-biting midges (*Corethrella* species). *International Journal of Acarology*. 41(5): 389-392.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294–299.
- Grabham, M. 1906. A new *Corethrella* from Jamaica. *Entomological News*. 17: 343–345.
- Gil-Azevedo, L. H., Correa, C. C., y Borkent, A. 2016. Family Corethrellidae. *Zootaxa* 4122 (1): 78-181.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., and Ball, S. L. y de Waard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: *Biological Sciences*. 270(1512): 313-321.
- Hernandez-Triana, L. M., Brugman, V. A., Prosser, S. W. J., Weland, C., Nikolova, N., Thorne, L., y Johnson, N. 2017. Molecular approaches for blood meal analysis

and species identification of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in rural locations in southern England, United Kingdom. *Zootaxa* 4250(1): 67-76.

Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática (INEGI). 1985. Síntesis geográfica del Estado de San Luis Potosí [En línea]. https://www.google.com.mx/search?rlz=1C1PRFC_enMX749MX749&ei=CeB_WtixA86cjwOKwbvgCw&q=ubicacion+geografica+de+san+luis+potosi+pdf&oq=ubicacion+geografica+de+san+luis+potosi+pdf&gs_l=psyab.3...12974.15270.0.15690.4.4.0.0.0.209.741.0j3j1.4.0...0...1c.1.64.psyab..0.3.574...0i22i30k1j33i160k1j33i21k1.0.Fh96dxlVO-0. [Fecha de consulta: 25/01/2018].

Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática (INEGI). 2001. Aspectos generales. Síntesis geográfica del Estado de Tabasco [En línea]. http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/historicos/2104/702825223939/702825223939_2.pdf. [Fecha de consulta: 25/01/2018].

Lane, J. 1939a. Notes on non hematophagous Culicidae. *Boletim Biologico, Clube Zoologico do Brasil*. 4: 99–113.

Lane, J. 1939b. Non-hematophagous Culicidae. (second paper). *Boletim Biologico, Clube Zoologico do Brasil*. 4: 386–393.

Lane, J. 1942. Dixinae e Chaoborinae. Révisão das espécies neotropicas (Diptera, Culicidae). *Revista de entomología* (Rio de Janeiro). 13: 81-148.

Lane, J. 1951. Synonymy of Neotropical Culicidae (Diptera). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 53: 333-336.

Lane, J. 1953. Neotropical Culicidae. Volume 1. University of São Paulo, Brazil. 548 pp.

McKeever, S. 1977. Observations of *Corethrella* feeding on tree frogs (*Hyla*). *Mosquito News*. 37: 522–523.

- McKeever, S. 1988. A new species of Mexican *Corethrella* (Diptera: Chaoboridae) and a description of a new antennal sensillum. *Annals of the Entomological Society of America*. 81: 400–402.
- McKeever, S., y French, F. E. 1991. *Corethrella* (Diptera: Corethrellidae) of North America north of Mexico: distribution and morphology of immature stages. *Annals of the Entomological Society of America*. 84(5): 522-530.
- Méndez-López, R., Castillo-Martínez, A., Covarrubias-Castro, J. L., Siller-Rodríguez, Q. K., Cueto-Medina, S. M., y Ortega-Morales, A. I. 2015. Atracción de *Uranotaenia lowii* (Diptera: Culicidae) al sonido de canto de ranas (Amphibia: Anura) en Tabasco, México. *Entomología Mexicana*. 2: 547-551.
- Robert V. y Borkent, A. 2014. First record of Corethrellidae (Diptera), frog-biting midges, in Madagascar. *Malagasy Nature*. (8): 49-53.
- Silva, D. B., Vesgueiro, F. T., Sallum, M. A. M, y Marrelli, M. T. 2011. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *Journal of medical entomology*. 48(2): 272-279.
- Shannon, R.C. y Del Ponte, E. 1928. Los Culicidos en la Argentina. *Revista del Instituto Bacteriologico*. 5: 29–147.
- Vargas, L. 1946. *Corethrella (Corethrella) laneana* n.sp. (Diptera. Culicidae), procedente de Monterrey, N.L. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. 13: 57–62.
- Vargas, L. 1952. Dos nuevas especies Mexicanas de *Corethrella* (Diptera: Culicidae). *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 13: 57–62.

ANEXO 1

Registros de mosquitos xv: las mosquitas picadoras de ranas (Diptera: Corethrellidae) de la colección de mosquitos del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna

Índice de colectores

ACM: Antonio Castillo-Martínez

MMB: Moisés Martínez-Burciaga

AGH: Javier Alfonso Garza-Hernández

OPV: Otoniel Pérez-Ventura

AIOM: Aldo I. Ortega-Morales

RILL: Robinzon Ismael López-López

HGA: Vicente Homero González-Álvarez

RML: Ramón Médez-López

IRA: Ignacio Ruíz Arrondo

SMA: Salvador Morales-Avitia

Cuadro 1. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en la localidad de puerto de Mamey, Aquismón, San Luis Potosí.

N° Colecta 25141013-PM	Estado San Luis Potosí	Municipio Aquismón	Localidad Puerto de Mamey	Colectores AIOM, OPV RILL, MMB	Fecha 14-Oct-13	Posición 21°37'12''N 99°2'45.5''W	Altitud 206 msnm	Hora colecta 21:00-10:00
Tipo de colecta Trampa CDC Luz incandescente Atrayente Octanol	Expedición AQUISMÓN II	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Ambiente Rural	Terreno Montañoso	Número de BIN BOLD:ADI5757 BOLD:ADJ3958 BOLD: ADJ1057	Especies <i>C.appendiculata</i> 1 <i>Corethrella</i> sp. 1 <i>Corethrella</i> sp. 2	

Cuadro 2. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en la localidad de San Isidro Tampaxal, Aquismón, San Luis Potosí.

N° Colecta 18161013-SIT	Estado San Luis Potosí	Municipio Aquismón	Localidad San Isidro Tampaxal	Colectores AIOM, OPV RILL, MMB	Fecha 16-Oct-13	Posición 21°31'31.6''N 99°1'58''W	Altitud 405 msnm	Hora colecta 20:00-10:00
Tipo de colecta Trampa CDC Luz incandescente Atrayente Octanol	Expedición AQUISMÓN II	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Ambiente Rural	Terreno Montañoso	Número de BIN BOLD:ADI5757 BOLD:ADI8036		Especies <i>C.appendiculata</i> 1 <i>Corethrella</i> n. sp. 1

Cuadro 3. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en la localidad de Cárdenas 1era Sección, Comalcalco, Tabasco.

N° Colecta 14170714-C	Estado Tabasco	Municipio Comalcalco	Localidad Cárdenas 1era sección	Colectores AIOM, RML SMA, ACM	Fecha 17-Jul-14	Posición 18°19'19.8''N 93°26'8.6''W	Altitud 10 msnm	Hora colecta 21:00-9:00
Tipo de colecta Trampa CDC Luz incandescente Atrayente Octanol Con sonido de canto de ranas	Expedición CUAC1414-A	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Rural	Terreno Valle con charcas y pantanos cerca	Número de BIN BOLD:ADI5867 BOLD:ADI6014 BOLD:ADI8208 BOLD:ADI9178 BOLD:ADI6344 BOLD:ADI7310	Especies <i>C. amazonica</i> <i>C. edwardsi</i> <i>C. quadrivittata</i> <i>C. vittata</i> <i>Corethrella</i> n. sp. 2 <i>Corethrella</i> n. sp. 3

Cuadro 4. Registro de colecta de mosquitos picadoras de ranas en la localidad de Grutas del Coconá, Teapa, Tabasco.

N° Colecta 07200715-T	Estado Tabasco	Municipio Teapa	Localidad Grutas del Coconá	Colectores AIOM, AGH, RML, SMA	Fecha 20-Jul-15	Posición 17°33'48.2''N 92°55'42.4''W	Altitud 48 msnm	Hora colecta 21:00-9:00
Tipo de colecta Trampa CDC Luz incandescente Atrayente Octanol	Expedición CUAC1414-B	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Rural	Terreno Montañoso	Número de BIN BOLD:ADJ2979	Especies <i>C. appendiculata</i> 2

Cuadro 5. Registro de colecta de mosquitos picadoras de ranas en los pantanos de Centla, Centla, Tabasco.

N° Colecta 06260715-PC	Estado Tabasco	Municipio Centla	Estado Pantanos de Centla (Centro de Referencia)	Colectores AIOM, RML SML, AGH	Fecha 26-Jul-15	Posición 18°24'26.2''N 92°38'51.9''W	Altitud 9 msnm	Hora colecta 20:00-9:00
Tipo de colecta Trampa CDC Luz incandescente Atrayente Octanol Con sonido de cantos de ranas	Expedición CUAC1414-B	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Rural	Terreno Valle con pantanos cerca	Número de BIN BOLD:ADI7712 BOLD:ADI6344 BOLD:ADJ1531	Especies <i>C. squamifemora</i> <i>Corethrella</i> n. sp. 2 <i>Corethrella</i> n. sp. 4

Cuadro 6. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en la Chontalpa, Huimanguillo, Tabasco.

N° Colecta 23201015-LC	Estado Tabasco	Municipio Huimanguillo	Localidad La Chontalpa	Colectores AIOM, RML,SMA AGH, HGA	Fecha 20-Oct-15	Posición 17°39'42.2"N 93°28'12.4"W	Altitud 54 msnm	Hora colecta 20:00-9:00
Tipo de colecta Trampa CDC Atrayente Octanol Con sonido de cantos de ranas	Expedición CUAC1414-C	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Ambiente Silvestre	Terreno Valle	Número de BIN BOLD:ADJ1889		Especies <i>Corethrella</i> sp. 3

Cuadro 7. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en Chimalapa 2a, Huimanguillo, Tabasco.

N° Colecta 10211015-CH	Estado Tabasco	Municipio Huimanguillo	Localidad Chimalapa 2a	Colectores AIOM, RML,SMA AGH, HGA	Fecha 21-Oct-15	Posición 17°24'36.3"N 93°37'53.5"W	Altitud 59 msnm	Hora colecta 20:00-9:00
Tipo de colecta Trampa CDC Atrayente Octanol Con sonido de cantos de ranas	Expedición CUAC1414-C	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Rural	Terreno Montañoso	Número de BIN BOLD:ADI7309 BOLD:ADI7310	Especies <i>C. puella</i> <i>Corethrella</i> n. sp. 3

Cuadro 8. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en Villa Luz, municipio de Tacotalpa, Tabasco.

N° Colecta 13271015-VL	Estado Tabasco	Municipio Tacotalpa	Estado Villa Luz	Colectores AIOM, RML AGH	Fecha 27-Oct-15	Posición 17°26'46.1''N 92°45'51.9''W	Altitud 28 msnm	Hora colecta 19:00-12:00
Tipo de colecta Trampa CDC Atrayente Octanol Con sonido de cantos de ranas	Expedición CUAC1414-C	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Silvestre	Terreno Montañoso	Número de BIN BOLD:ADJ2979 BOLD:ADI7309 BOLD:ADI5565	Especies <i>C. appendiculata</i> 2 <i>C. puella</i> <i>C. selvicola</i>

Cuadro 9. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en Niños Héroes, Tenosique, Tabasco.

N° Colecta 01041115-NH	Estado Tabasco	Municipio Tenosique	Estado Niños Héroes	Colectores AIOM, RML HGA	Fecha 4-Nov-15	Posición 17°16'40''N 91°24'12''W	Altitud 220 msnm	Hora colecta 20:00-8:00
Tipo de colecta Trampa CDC Atrayente Octanol Con sonidos de cantos de ranas	Expedición CUAC1414-C	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Silvestre	Terreno Montañoso	Número de BIN ----- BOLD:ADI7309 BOLD:ADI5565	Especies <i>C. aridicola</i> <i>C. puella</i> <i>C. selvicola</i>

Cuadro 10. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en Niños Héroes, Tenosique, Tabasco.

N° Colecta 02041115-NH	Localidad Niños Héroes	Municipio Tenosique	Estado Tabasco	Colectores ALOM, RML HGA	Fecha 4-Nov-15	Posición 17°16'40''N 91°24'12''W	Altitud 220 Msnm	Hora colecta 20:00-8:00
Tipo de colecta Trampa CDC Luz incandescente Atrayente Octanol	Expedición CUAC1414-C	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Silvestre	Terreno Montañoso	Número de BIN BOLD:ADI7310	Especies <i>Corethrella</i> n. sp. 4

Cuadro 11. Registro de colecta de mosquitas picadoras de ranas en la Zona Arqueológica de Comalcalco, Tabasco.

N° Colecta 15161115-C	Estado Tabasco	Municipio Comalcalco	Localidad Zona Arqueológica	Colectores AIOM, RML AGH, IRA	Fecha 16-Nov-15	Posición 18°16'48.3''N 93°12'19.1''W	Altitud 3 msnm	Hora colecta 1:00-8:00
Tipo de colecta Trampa CDC Luz incandescente Atrayente Octanol	Expedición CUAC1414-C	Viento Ausente	Cielo Oscuro	Sombra Total	Ambiente Silvestre	Terreno Valle	Número de BIN BOLD:ADI8208	Especies <i>C. quadrivittata</i>