EXPANSIÓN DE LA POBLACIÓN DE CULICOIDES IMICOLA EN ESPAÑA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA MISMA, BASADO EN EL ANÁLISIS DEL GEN DE LA CITOCROMO OXIDASA SUBUNIDAD I (COI).

Calvo J.H.[1], Calvete C.[1], Martinez-Royo A.[1], Estrada R.[2], Miranda M.A.[3], Borrás D.[3], Sarto i Monteys V.[4], Pages N.[4], Delgado J.A.[5], Collantes F.[5], Lucientes J.[2]

1. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA). Gobierno de Aragón. Zaragoza.
2. Dpto. Patología Animal. Universidad de Zaragoza.
3. Laboratorio de Zoología. Universidad de las Islas Baleares. Palma de Mallorca.
4. Unidad de Entomología. Fundación CReSA. Universidad Autónoma de Barcelona.
5. Dpto. Zoología y Antropología Física. Universidad de Murcia.

E-mail: jhcalvo@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La Lengua azul es una enfermedad vírica cuyos principales vectores biológicos son ciertas especies de dípteros del género *Culicoides*, siendo *Culicoides imicola* el principal vector. El virus parece infectar a todas las especies conocidas de rumiantes, aunque la enfermedad suele manifestarse de forma más severa en el ovino (incluso produciendo la muerte), en especial en determinadas razas, y en algunas especies de ciervos.

Hasta la fecha, todas las epizootías de Lengua Azul y Peste Equina (cuyo vector también es *C. imicola*) acaecidas en la Península Ibérica han estado limitadas geográficamente a la mitad sur de la misma. Los trabajos pioneros realizados sobre *C. imicola* en la Península Ibérica (Ortega *et al.*, 1997, Rawlings *et al.*, 1997) demostraron que esta limitación geográfica estaba asociada a la distribución del vector, presente principalmente en el suroeste de la península, en donde se dan de forma más generalizada los requisitos necesarios de hábitat para mantener poblaciones estables y abundantes. Sin embargo, el hallazgo en otros estudios más recientes de poblaciones de esta especie de mosquito en las Islas Baleares y Cataluña (Miranda *et al.*, 2003, Sarto i Monteys, 2005), así como la aparición de la enfermedad en regiones europeas más al norte del paralelo 40º N, hacen sospechar de una expansión septentrional de la enfermedad y de sus vectores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Insectos. 255 insectos fueron recogidos de 58 localizaciones en España.

Extracción de DNA y análisis del gen *COI.* El DNA total fue extraído de mosquitos individualmente usando el kit Nucleo Spin Tissue (Mancherey-Nagel, Düren, Germany). El DNA mitocondrial (50 ng) fue amplificado usando los siguientes cebadores: 5'-*GGAGGATTTGGAAATTGATTAGT*-3' y 5'- *CAGGTAAAATTAAAATATAAACTTCTGG*-3' (Dallas *et al.*, 2003) en un volumen final de 25 μl conteniendo 5 pmol de cada cebador, 200 μM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 y 0.5 U *Taq* polymerase (Biotools, Spain). Se amplificó un fragmento del gen *COI* de 523 p.b. (de 1 a 10 *C. imicola* de cada localización), secuenciando dicho producto amplificado con los cebadores descritos anteriormente.

Análisis estadístico. Los índices de variación nucleotídica, estructura haplotípica, y test de neutralidad fueron calculados usando DnaSP 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). MEGA 2.0 fue utilizado para calcular la matriz de distancias entre poblaciones, y para construir árboles filogenéticos neighbour joining, utilizando métodos de remuestreo "bootstrap". El cálculo del estadístico Fst, así como la distribución de la variabilidad total encontrada entre poblaciones se calculó usando el programa Arlequin (http://anthropologie.unige.ch/arlequin/). La distribución del número de diferencias nucleotídicas entre cada combinación de haplotipos (distribución "mismatch), y el índice de Harpening raggedness fueron calculados para estimar recientes expansiones numéricas, así como espaciales, usando Arlequin. Finalmente, Network version 4.1.1.2 (http://www.fluxus-engineering.com), se utilizó para establecer conexiones en red (median joining networks) entre los haplotipos de nuestra muestra. Las relacciones entre los haplotipos del gen COI fueron analizados a dos niveles jerárquicos de *C. imicola*: 1) Poblaciones de *C. imicola* en España, 2) *C. imicola* total (las secuencias analizadas en este estudio y las depositadas en la base de datos GenBank de otros países y localizaciones: AJ867227, AJ867228, AJ877224, AJ877225, AJ867232-AJ867234, AJ867226, AJ549415-AJ549426, AJ867229-AJ867231, AJ549388-AJ549392,

AF078097, AJ549393-AJ549414, AF080531, AF080532, AF080534, AF080535, AF078098-AF078100, AF069231-AF069233, AF069249).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia analizada del gen COI de los *C. imicola* en España, contiene 19 haplotipos definidos por 15 sitios polimórficos, existiendo dos sustituciones no-sinónimas (en las posiciones 69 y 136). Considerando la población total, se encontraron 34 haplotipos definidos por 27 mutaciones, siendo cinco sustituciones no-sinónimas (posiciones 46, 69, 115, 136, y 253). En total, 11 nuevos haplotipos no descritos hasta ahora fueron encontrados en la población Española (GenBank acc. Number DQ868882, DQ868883, DQ868886-DQ868890, DQ868892, DQ868894, DQ871030). La diversidan nucleotídica (π) y haplotípica (Hd) en España y la población total fueron $\pi = 0.00132 \pm 0.17 \times 10^{-3}$ - Hd=0.428± 0.043, y $\pi = 0.00344 \pm 0.14 \times 10^{-3}$- Hd=0.596± 0.035, respectivamente. En las poblaciones españolas se encontró la máxima diversidad en Ceuta, Tarifa y Mijas, mostrando que un importante flujo genético ocurre entre el Norte de África y España. El exceso de alelos encontrados, no implica altos niveles de variación, ya que la muestra presento un exceso de variantes en baja frecuencia y una variante en alta frecuencia. Los niveles de variación en la población mundial fueron similares a las españolas.

En la población Española, los índices de diferenciación genética mostraron que las poblaciones analizadas no se pueden considerar como poblaciones aisladas, mostrando un elevado flujo genético entre las mismas (*Nm*=125.98 migrantes por generación). El análisis AMOVA mostró que el 96.44% de la varianza total fue debida a diferencias genéticas entre individuos, mostrando una población mínimamente estructurada (*Fst*= 0.00398). En la población mundial de *C. imicola* estructurada como Mediterráneo occidental (Portugal, España, Marruecos e Italia), Mediterráneo Oriental (Israel y Grecia) y Sudáfrica, *Fst* y *Nm* fueron 0.788 y 0.07 respectivamente, siendo el 78.8% de la varianza total debida a diferencias entre poblaciones. Dallas *et al.* (2003), sugieren que el nivel de subdivisión maternal en *C. imicola* entre el Mediterráneo occidental y Oriental es alto, y comparable con la división geográfica de los serotipos del BT Virus (BTV) en los brotes aparecidos en el Mediterráneo. Esto fue confirmado en nuestro estudio analizando la distribución "mismath" entre poblaciones. Dos picos indican la presencia de grupos divergentes de haplotipos (Figura 1), un pico en 0 diferencias nucleotídicas (haplotipos del Mediterráneo occidental) y el segundo en 4 diferencias nucleotídicas (haplotipos del Mediterráneo oriental), indicando dos origenes genéticos distintos. Además, el análisis de conexiones de red (median joining networks) mostraron un haplotipo faltante (mv1) entre los haplotipos orientales y occidentales (Figura 2), confirmando los dos orígenes distintos. Los análisis de conexiones de red también mostraron en la población Española una estructura filogenética de estrella, teniendo en su centro el haplotipo más común (Figura 2). Este tipo de estructura poblacional se explica como una rápida expansión tras en proceso genético de cuello de botella, siendo en estos casos la diversidad nucleotídica y haplotípica baja. Estos resultados junto con el árbol filogenético neighbour joining sugieren la falta de flujo genético entre el mediterráneo oriental y occidental, exceptuando el Mediterráneo Central en el que haplotipos encontrados en Sicilia se encuentran en *Culicoides imicola* del Mediterráneo Oriental y Occidental (Dallas *et al.,* 2003).

Para verificar si la población española estaba en expansión se llevaron a cabo diversos test de neutralidad. El test de *Fu's Fs* resultó significativo (-21.57196 ; $p< 0.001$), indicando una clara desviación de la frecuencia de alelos esperada debido al excesivo número de alelos raros. El test *Tajima's D* fue -1.99 ($P < 0.05$), mientras que el test *D** fue -1.353 ($P > 0.10$). Los índices negativos de los test de *Fu* and *Li's* and *Tajima's* indican un exceso de variantes en baja frecuencia, pudiendo esta baja frecuencia de mutaciones nuevas, ser un indicador de expansión de la población. Para confirmar esta hipótesis, se calculó la distribución mismatch de la población Española (Figura 1), mostrando una distribución unimodal, como es esperable en el caso de una expansión de la población(Rogers y Harpending, 1992; Slatkin y Hudson, 1991), con altos niveles de migración entre las poblaciones vecinas(Ray *et al.*, 2003; Excoffier, 2004). Por otra parte la distribución de datos no difieren de lo esperado bajo un modelo de expansión numérica de la población (Suma al cuadrado de las desviaciones = 0.00038, $P = 0.650$; índice Harpending's

raggedness = 0.12, *P* = 0.800) o espacial (suma al cuadrado de las desviaciones = 0.00038, *P* = 0.800; índice Harpending's raggedness = 0.12, *P* = 0.700). El índice Harpending's raggedness fue bajo, lo que indica una distribución unimodal. Estos resultados y la presencia de un haplotipo común en todas las poblaciones muestreadas, así como la aparición por primera vez de *Culicoides imicola* en localizaciones más al norte de la península que no habían aparecido hasta la fecha, indican una expansión de la población hacia nuevas localizaciones situadas más al norte de la península. Asumiendo, que todos los haplotipos encontrados son igualmente competentes para la transmisión del virus por vectores, la expansión hacia el norte de la Península Ibérica tiene importantes implicaciones en la epidemiología y expansión de la BTV.

Agradecimientos. Los autores de este trabajo agradecen a los servicios veterinarios de los Gobiernos de las diferentes Comunidades Autónomas su esfuerzo para realizar las capturas de los insectos. Trabajo subvencionado por la Subdirección General de Sanidaad Animal del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPyA).

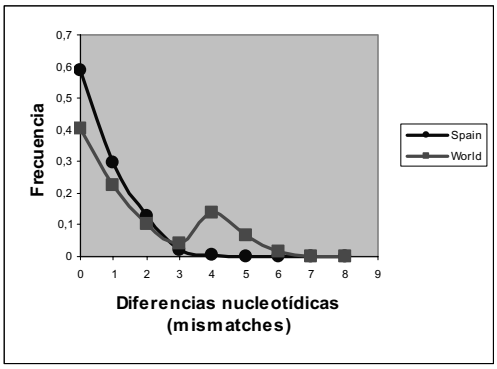


Figura 1. Distribución del número de diferencias nucleotídicas entre las diferentes combinaciones haplotípicas de mtDNA de *Culicoides imicola* de España (Spain) y la total (World).

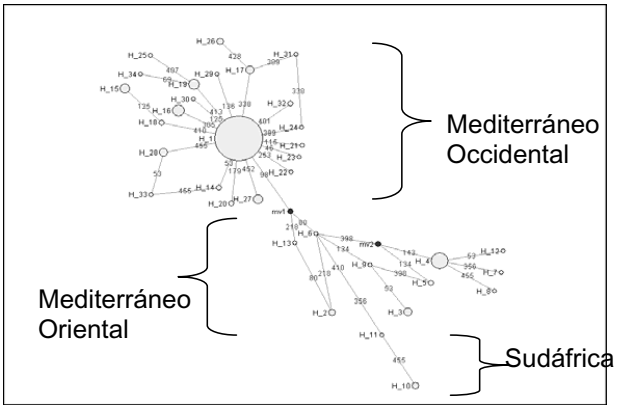


Figura 2. Análisis de conexiones de red (median joining network) El diagrama muestra las relaciones entre haplotipos y la frecuencia de los mismos. El número de haplotipo muestra el IMICOI haplotipo (Dallas et al. 2003). El diámetro de H_6 (IMICOI 6) representa un animal. Los números indican la posición relative del nucleotide mutado en relacción a la secuencia DQ868882.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Dallas, J.F. *et al.* 2003. Medical and Veterinary Entomology, 17, 379-87. • Excoffier, L. 2004. Molecular Ecology 13(4), 853-864. • Miranda, M. A. *et al.* 2003. Medical and Veterinary Entomology, 17, 52-54. • Ortega, M.D. *et al.* 1999. Journal of the American Mosquito Control Association, 15 (3), 391-399. • Rawlings, P. et al. 1997. Medical and Veterinary Entomology, 11, 49-57. • Ray, N. *et al.* 2003. Molecular Biology and Evolution, 20(1), 76-86.• Rogers, A. R., y Harpending, H. 1992. Molecular Biology and Evolution, 9, 552-569. • Rozas, J. *et al.* 2003. Bioinformatics, 19 (18): 2496-2497.• Sarto i Monteys, V. *et al.* 2005. Veterinary Record, 156, 415-417. • Slatkin, M. y Hudson, R.R. 1991. Genetics, 129 (2), 555-562.