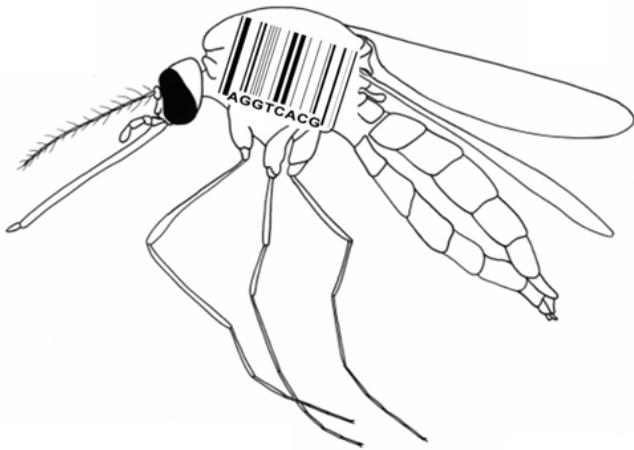
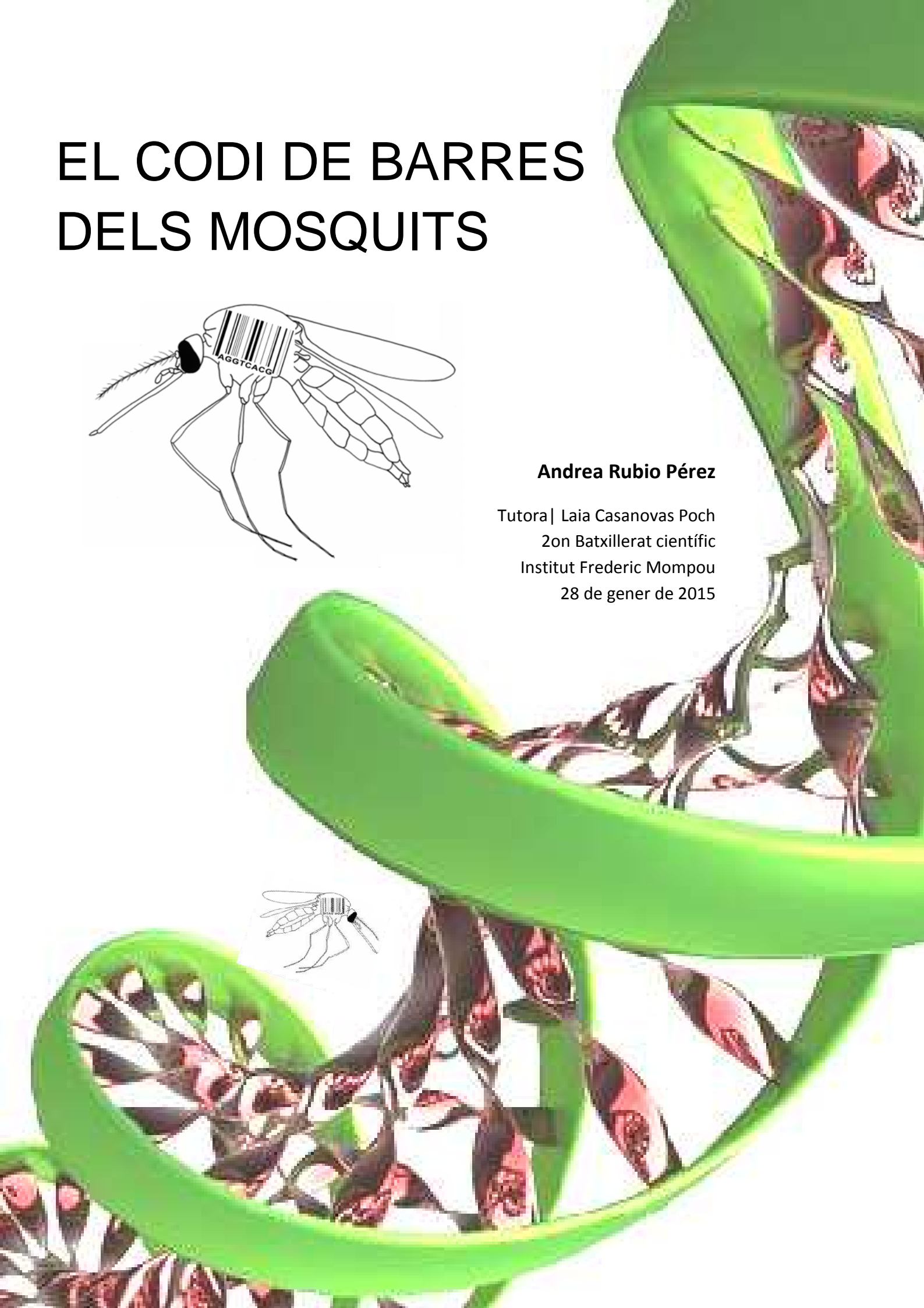
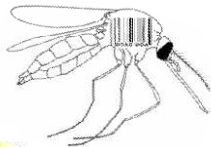


# EL CODI DE BARRES DELS MOSQUITS



**Andrea Rubio Pérez**

Tutora | Laia Casanovas Poch  
2on Batxillerat científic  
Institut Frederic Mompou  
28 de gener de 2015



# Índex

1. Introducció.....	4
2. Objectius.....	5
3. Nocions introductòries.....	6
3.1. El cicle biològic dels mosquits.....	6
3.2. L'hàbitat.....	9
3.3. Els mosquits, transmissors de malalties.....	10
3.4. Els mosquits i la resistència als insecticides.....	12
3.5. La identificació d'espècies i DNA barcoding.....	14
4. Estudi morfològic i molecular.....	16
4.1. Treball de camp.....	16
4.1.1. Introducció.....	16
4.1.2. Material de recollida.....	16
4.1.3. Mètode.....	18
4.1.3.1. La caça dels mosquits adults.....	20
4.1.3.2. La captura de les larves.....	22
4.1.3.3. L'emmagatzematge.....	23
4.2 Estudi al laboratori.....	25
4.2.1. Introducció.....	25
4.2.2. Classificació morfològica.....	25
4.2.2.1. Introducció.....	25
4.2.2.2. Mètode.....	26
4.2.2.3. Descripció d'espècies identificades.....	26
4.2.2.4. Abundància relativa i distribució a l'àrea d'estudi.....	36
4.2.2.5. Comparació amb altres estudis.....	39

4.2.3. Classificació molecular: seqüenciació del DNA.....	41
4.2.3.1. Introducció.....	41
4.2.3.2. Plantejament de l'estudi.....	41
4.2.3.3. Material del laboratori.....	42
4.2.3.4. Mètode.....	46
4.2.3.5. Resultats.....	72
4.2.3.6. Conclusions.....	75
5. Conclusions generals .....	76
6. Agraïments.....	78
7. Bibliografia.....	79
8. Annexos.....	82

# 1. INTRODUCCIÓ

Els mosquits són insectes que pertanyen a l'ordre Diptera i la família Culicidae. Són al voltant de 3.500 espècies de culícids diferents en el món (Harbach i Howard, 2007). Avui dia, hi ha una gran quantitat de mosquits que comporten un risc de malalties ja que moltes estan transmeses per vectors associats amb els mosquits. Per això, s'ha de mantenir un control i evitar l'excés de població.

Actualment vivim en l'època dels genomes. El genoma apareix com una explicació natural i comuna de tots els éssers vius, basada en els trets fonamentals del DNA. El genoma, que conté tots els gens de cada espècie, és la base de la reconstrucció de l'evolució i la clau per descobrir més coses sobre la diversitat biològica.

El mètode actual i clàssic per determinar les espècies que poblen la terra, i entre elles els mosquits, és utilitzar claus dicotòmiques de classificació basades en la comparació morfològica dels individus, aquest és el mètode que Carl Linnaeus desenvolupà el 1700. Des que Watson i Crick van presentar el seu model de l'ADN de doble hèlix el 1953 però, va començar una nova era d'estudis moleculars que han revolucionat el camp de la taxonomia. La revolució no és en termes del nou mecanisme de classificació sinó pels canvis que apareixen en el coneixement de la diversitat biològica a la Terra. No obstant això, la morfologia, l'ecologia i les característiques de comportament són encara importants i s'utilitzen juntament amb la informació d'un gen o de tot el genoma per acabar de definir les espècies.

El codi de barres d'ADN és un dels mètodes prometedors per a la identificació molecular de les espècies. Un petit segment d'un gen, aproximadament d'entre 400-1000 parells de bases (pb), són examinats per una polimerasa de reacció en cadena (PCR) i la posterior seqüenciació. Aquest segment permetrà la caracterització de l'espècie.

El nostre Treball de Recerca ens mostra els dos mètodes de classificació, el morfològic per la identificació d'espècies que són fàcilment distingibles morfològicament i sense possibilitat d'error i el molecular per la identificació d'aquelles que són tan semblants que altrament, seria impossible d'arribar a classificar.

Si bé el mètode morfològic és més ràpid, el molecular, basat en seqüències idèntiques de DNA, no deixa cap dubte sobre l'espècie identificada. Tot i això, no cal fer-lo servir en els casos que la identificació morfològica és clara ja que és complicat i costós.

En aquest treball els farem servir tots dos i intentarem aportar reflexions interessants a l'hora que aportarem dades que fins ara eren desconegudes.



*Culex pipiens* (esquerra)  
i *Culex torrentium*  
(dreta). Dues espècies  
difícils de classificar  
morfològicament.



## 2. OBJECTIUS

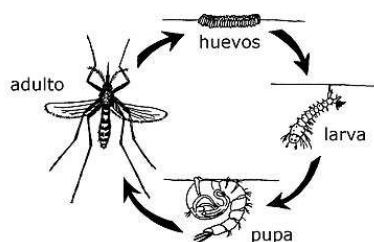
L'objectiu principal d'aquest Treball de Recerca ha estat provar el concepte de codi de barres d'ADN per a la identificació de diferents espècies de mosquits catalans. Ens hem basat en la identificació morfològica en primer terme i en la identificació molecular a partir de la seqüenciació d'ADN per dues espècies concretes, impossibles de distingir morfològicament. Concretament els nostres objectius han estat:

- Estudiar les diferents espècies de mosquits que trobem a Sant Vicenç dels Horts en diferents ambients (boscs, camps i cases) i els que trobem a alta muntanya. Estudiar la distribució de les diferents espècies i la seva abundància relativa als diferents ambients.
- Utilitzar tècniques moleculars per classificar espècies difícils de distingir morfològicament: *Culex pipiens* vs *Culex torrentium*.
- Analitzar les poblacions de *Culex pipiens* i *Culex torrentium* a baixa altitud (0-1000m) i a alta muntanya (1300m).
- Valorar els dos mètodes de classificació d'espècies, el morfològic, a partir de claus dicotòmiques de classificació i el molecular, amb la seqüenciació del DNA.
- Avaluar l'efectivitat d'un sistema relativament ràpid d'identificació de mosquits, el DNA barcoding system, com a eina d'identificació d'espècies de mosquit.

## 3. NOCIONS INTRODUCTORIES

### 3.1. EL CICLE BIOLÒGIC DELS MOSQUIT

En aquest apartat descriurem el cicle vital dels mosquits, imprescindible per interpretar les variacions en el nombre d'adults de les poblacions i poder tenir un bon control de les d'aquestes.



Cicle biològic d'un mosquit

Els mosquits s'adapten molt bé a qualsevol massa d'aigua estancada encara que tingui poc volum per criar. Els deltes acostumen a ser zones propícies per la cria ja que tenen un conjunt de biòtops favorables pel desenvolupament de les cries. Les femelles fèrtils, un cop han ingerit la sang dels vertebrats, fan la maduració dels ous i els dipositen sobre la superfície aquàtica en grups o navícules de 100 o 300 unitats, com es el cas dels *Culex* i *Culiseta*, individualment sobre la superfície de l'aigua, en el cas dels *Anopheles*, i sobre la terra seca inactius fins que el terreny s'inunda, com és el cas dels *Aedes* i *Ochlerotatus*.

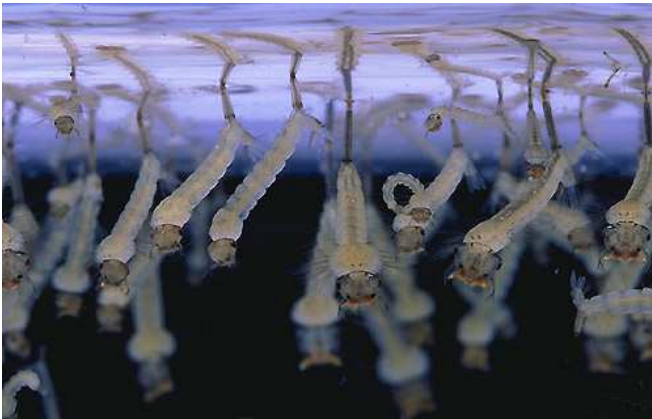
La fecundació dels ous es fa en el moment de la posta però l'acoblament es realitza abans. Hi ha generalment una sola posta al principi de la vida de l'adult. En aquesta copula l'esperma queda emmagatzemat dins la femella on es conserva al llarg de tota la seva vida. El nombre d'ous varia segons les espècies i també la quantitat de sang xuclada. Si la femella ha pogut xuclar suficient quantitat de sang sense ser molestada, una sola picada acostuma a ser suficient per produir una posta i no picarà de nou fins que l'hagi realitzat. El mosquit tigre però, sol fer un seguit de xuclades successives, fins i tot arriba a perseguir a les preses, per aconseguir tota la sang que necessita.



Posta d'ous de mosquit

Aquests ous originen unes **larves** les quals són sempre aquàtiques. Les larves tenen quatre estadis de creixement separats per canvis de mudes. La durada de l'estadi de larva depèn de la temperatura ja que, per exemple, al Delta del Llobregat el desenvolupament larvari de *Culex pipiens* dura entre 5 i 7 dies a l'estiu però, en canvi, amb temperatures més altes dura molt més. En aquest període les larves creixen d'1mm a uns 12mm de longitud i es desplacen mitjançant contraccions abdominals.

Durant el creixement larvari les larves s'alimenten de la matèria orgànica d'algues unicel·lulars i de bacteris. Les larves de la majoria d'espècies (excepte del gènere *Coquillettidia*) capten l'aire atmosfèric; això ho fan mitjançant un sífó respiratori situat a l'extrem de l'abdomen que queda arran de la superfície de l'aigua en la seva posició habitual (de cap per avall). Totes les espècies tenen aquest sífó que els permet respirar l'aire exceptuant les del gènere *Anopheles* que es col·loquen paral·lelament a l'aigua respirant directament per l'extrem de l'abdomen. Aquestes larves poden habitar en tot tipus d'aigües tant salades com dolces, netes o contaminades i permanents o no.



Larves a la superfície de l'aigua

Quan la larva es troba en el quart estadi deixa d'alimentar-se i esdevé **pupa**. Aquest procés dura unes 48 hores i és on es produeixen els canvis estructurals per tal que la larva esdevingui mosquit adult. Més concretament, aquestes transformacions comencen al final del desenvolupament larvari per la lisi dels músculs i continuen a l'estadi nimfal en què s'elabora un nou sistema. La pupa no s'alimenta ja que aprofita les reserves acumulades al estadi larvari i respira mitjançant dues "trompetes" situades sobre el cefalotòrax. En el moment en que gairebé és un mosquit adult, l'exosquelet es trenca longitudinalment i l'adult s'infla d'aire i surt de la despulla pupal a la superfície de l'aigua. S'hi queda un curt període fins que és capaç de volar.



Pupa de mosquit

Els **adults**, tant els mascles com les femelles, s'alimenten del nèctar de les flors. Però, a més, les femelles piquen per obtenir sang per tal d'aportar proteïnes a la maduració dels ous; és tan necessària aquesta sang pel creixement de les seves cries que són capaces de recórrer quilometres per cercar-la.

Els mosquits piquen sobretot als vertebrats, tot i que cada espècie té unes preferències per un tipus de vertebrat com la *Culiseta longiareolata* que prefereix les aus o el *Culex hortensis* que prefereix els amfibis.

Hi ha mosquits com els *Culex pipiens* que poden produir una primera posta sense picar anomenada autògena, la qual sobreviu gràcies a les reserves energètiques acumulades per la larva.

La majoria de mosquits piquen a unes hores concretes del dia, sobretot a la sortida i posta del sol (hores en que la temperatura ambient no és gaire alta) exceptuant el *Ochlaratus caspius* que pica a totes les hores del dia.

Els mascles viuen aproximadament una setmana i les femelles repeteix el cicle de reproducció fins que moren. La seva longevitat depèn de la temperatura, la humitat i la seva capacitat d'obtenir amb èxit un àpat de sang, tot evitant les defenses de l'hoste i els depredadors naturals. La majoria no viu més d'una o dues setmanes tot i que en captivitat poden arribar a viure durant més d'un mes.



*Mosquit adult sobre la pell humana. Normalment no viu més d'una o dues setmanes.*



### 3.2. L'HÀBITAT

L'hàbitat dels mosquits és pràcticament el **medi aquàtic** ja que les larves es desenvolupen a l'aigua i les femelles han de tornar-hi per pondre-hi els ous. Gairebé qualsevol massa d'aigua és adient pels mosquits, sempre i quan sigui aigua estancada o flueixi amb lentitud. A l'aigua no hi han d'estar gaire temps ja que en una setmana o deu dies ja poden aparèixer els nous mosquits. Els mosquits, en funció de l'espècie, prefereixen aigües més brutes o més netes, o bé més fredes o més calentes (tot i que generalment prefereixen temperatures altes).

Per exemple, l'espècie *Culex pipiens* acostuma a trobar-se en aigües brutes, tot i que s'adapta prou bé a tots els ambients, a uns 15°C, i encara que és capaç de suportar temperatures més baixes. És doncs, el rang de temperatures en que poden viure que fa que puguem trobar aquests mosquits durant tota la temporada d'estiu, des d'abril fins a octubre. En canvi, *Ochlerotatus caspius* prefereix zones susceptibles d'ésser inundades. Un altre exemple és el d'*Aedes albopictus* que es troba en espais petits de zones urbanes com galledes, cendrers... i a la zona de muntanya en els forats dels arbres plens amb aigua de pluja i als tolls que queden a les rieres, a llocs apartats del corrent. En aquests llocs també hi trobem espècies com *Anopheles claviger*, *Ochlerotatus vexans* i *Ochlerotatus geniculatus*.

En aquests hàbitats hi ha nombrosos enemics naturals dels mosquits. Les larves es troben exposades a depredadors com peixos, insectes adults i larves d'altres insectes.

Actualment es coneixen més de 3.000 espècies de mosquits, presents a totes les latituds. Al Baix Llobregat se'n troben 19 de diferents, distribuïdes en 7 gèneres: *Culex*, *Ochlerotatus*, *Aedes*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Anopheles* i *Uranotaenia*.



Forats dels arbres



Testos amb aigua on ponen els mosquits

### 3.3. ELS MOSQUITS, TRANSMISSORS DE MALALTIES

En molts països desenvolupats està augmentant la incidència de **malalties emergents** transmeses per mosquits. L'escalfament global, l'acceleració de la globalització i l'agilitat del transport entre països permeten exportar i importar fàcilment les malalties i els vectors que les transmeten. La Unió Europea ha patit brots i epidèmies, com la Febre dels Nil Occidental i la de Chikungunya, que es podrien haver introduït procedents de zones endèmiques, a través d'aus migratòries i de viatgers. Catalunya també es troba entre els països en risc a causa del seu elevat cens demogràfic, la gran afluència de turisme, la presència d'*Aedes albopictus* i les grans zones d'aiguamolls amb poblacions d'aus autòctones i migratòries. De fet, a Catalunya ja hi ha hagut casos de Chikungunya a l'any 2014.

La Febre del Nil Occidental és una malaltia que habitualment es cursa sense símptomes o amb símptomes lleus, però que en alguns casos pot produir efectes més greus, com encefalitis i, fins i tot, la mort. Aquesta malaltia pot ser transmesa pel mosquit tigre encara que amb menor freqüència que *Culex pipiens*. El virus d'aquesta malaltia creix i es propaga d'una au a una altra a través de mosquits infectats. Si els mosquits infectats amb el virus piquen als cavalls o als humans, l'animal o la persona poden emmalaltir. És endèmica en parts d'Àfrica, el Orient i Europa, i en les darreres dècades s'ha estat estenent a altres zones.

La Chikungunya és una malaltia infecciosa ocasionada per un arbovirus (un tipus de virus que aprofita els artròpodes com a vectors) i transmesa per la picada de mosquits femella del gènere *Aedes*, com ara el mosquit tigre, que també pot ser vector d'altres virus com el Dengue. La Chikungunya és endèmica de l'Àfrica, el Sud-est asiàtic, l'Índia i el Pakistan on apareix sobretot durant l'estació de pluges. Els símptomes consisteixen principalment en febre i dolor articular. La majoria de persones es recuperen completament, però no hi ha cap vacuna enfront aquest virus. Quan s'alimenten de la sang d'una persona infectada amb Chikungunya, els mosquits poden passar a ser transmissors de la malaltia durant, aproximadament, uns 10 dies després. Si durant aquests dies piquen a una persona susceptible d'identificar-se, aquesta pot incubar el virus durant 2-12 dies i després manifestar-ne els símptomes. No hi ha evidències de transmissió directa entre persones (sense que hi intervinguin els mosquits).



Mosquit tigre (*Aedes albopictus*)

Però, a més d'aquestes malalties que poden arribar a afectar als països desenvolupats el mosquit tigre també transmet altres malalties com el dengue a Amèrica Central, i a Sud-Amèrica i a la zona del Pacífic, la febre groga. Aquest mosquit és originari del sud-est asiàtic i és conegut per les ratlles blanques al cos i per la molèstia que provoca pel nombre tan elevat de picades.

Però no només és el mosquit tigre el que transmet malalties, el gènere *Anopheles* és transmissor d'una malaltia molt estesa, la malària. La malària és una protozoosi de caràcter febril produïda pel paràsit *Plasmodium* que s'encomana per la picada del mosquit *Anopheles* femella, que és el vector. Aquesta malaltia és la primera causa de malalties debilitants, i és la primera en importància entre aquest tipus de malalties, amb més de 200 milions de casos cada any en tot el món.

### 3.4. ELS MOSQUITIS I LA RESISTÈNCIA ALS INSECTICIDES

Molts **predadors naturals**, com les orenetes, els ratpenats, les gambúsies o les libèl·lules, són els nostres aliats en la lluita contra els mosquits.

Malgrat els diferents mètodes de control, els mosquits continuen sent un problema, i seria molt més greu, si no fos pel gran nombre de predadors que se'ls mengen, especialment els ocells. Cada família d'aquests ocells (2 adults i 5 polls), com les orenetes, consumeix uns 8.000 insectes al dia. A més s'han produït adaptacions en el seu organisme que els permeten caçar al vol. Els ratpenats també són uns grans insecticides, en una sola nit consumeixen de 1.400 a 2.800 mosquits cadascun. La gambúsia és un peix originari d'Amèrica del Nord introduït a moltes zones palustres a causa de la seva voracitat consumint larves de mosquit (en anglès s'anomena mosquito fish). Les libèl·lules són els predadors naturals més antics que tenen els mosquits. Ja van aparèixer molts milions d'anys abans que les orenetes, per exemple. A més, els depreden per partida doble. La larva aquàtica caça larves de mosquit i la libèl·lula adulta caça mosquits adults. Però per molta ajuda que tinguem dels predadors i per molt que combatem els mosquits no aconseguirem exterminar-los.

Però els humans intentem tenir **el control** sobre els mosquits i això ho fem bàsicament eliminant els mosquits adults amb insecticides químics.



*Diferents tècniques per combatre als mosquits*

Per combatre les larves utilitzem *Bacillus thuringiensis israelensis*, una espècie de bacteri que ens serveixen per matar les larves. Per combatre els adults hi ha dos tipus d'insecticides, els organofosfats que actualment s'han deixat d'utilitzar perquè són cancerígens a llarga durada i els piretroides que són els utilitzats. Aquest últims però, són repel·lents i tòxics per persones i peixos i, si no s'aplica bé per experts, els mosquits simplement els oloren i marxen. Aquests piretroides els tenim a mosquiteres tractades amb insecticides (MTI), mosquiteres tractades amb insecticides de llarga durada (MILD) i als aerosols residuals interiors (IRS). Malgrat que tots aquests insecticides afavoreixen la reducció de mosquits, darrerament hi està havent un increment de la resistència dels mosquits als insecticides. Ja s'ha detectat resistència ens els piretroides com la metometrina, la metrina o daltametrina (causa reaccions molt altes). Però a més a Sud Amèrica comença a haver-hi problemes amb els herotocides.

Per tal de reduir els efectes de la resistència s'han d'inventar nous insecticides químics en mosquiteres i IRS. Així doncs per augmentar l'eficàcia d'aquests productes químics cal tenir en compte les condicions microclimàtiques rellevants, és a dir, tenir en compte tant les temperatures durant el dia 25-27°C, en les que es fan el assajos, però a més, tenir en compte les diferents temperatures (més baixes a la nit) en què els mosquits estan en condicions reals al camp.

### 3.5. IDENTIFICACIÓ D'ESPÈCIES I DNA BARCODING

El mètode clàssic per identificar, etiquetar i classificar organismes es basa principalment en l'anàlisi dels seus trets morfològics. Aquest mètode va ser desenvolupat per Carl Linnaeus al segle XVIII i és encara el sistema taxonòmic que, en gran mesura, s'utilitza avui dia. Tot i que actualment els taxonomistes també consideren la fisiologia, el comportament i la biologia de poblacions a l'hora de classificar noves espècies.

Des del descobriment de l'ADN i del reconeixement del seu paper en l'herència, la variació genètica té un paper cada vegada més important a l'hora d'estudiar la diversitat de la vida. Així doncs, la **identificació morfològica** de les espècies és, òbviament, limitada, ja que no té en compte la plasticitat fenotípica, la variació genètica dels individus o la complexitat morfològica (Hebert et al., 2003a). La **identificació molecular** de l'ADN pot omplir aquest buit que la morfològica no és capaç de fer i, per tant, afegir més informació sobre la diversitat biològica ja coneguda. A més aquestes tècniques moleculars s'acostumen a utilitzar per a la identificació d'espècies de virus, bacteris i protozous que tan difícils són de classificar (Adl et al., 2007; Edwards and Rohwer, 2005; Pace, 1997). D'una manera més general, tota la seqüenciació del genoma i altres mètodes similars s'utilitzen per identificar la diversitat.

A causa de l'extensa diversitat biològica que hi ha, seria molt costós i consumiria molt de temps intentar de comparar el DNA complet de diferents organismes, per tant, una forma més adequada per identificar espècies és analitzar petits segments de gens, el que hem anomenat el codi de barres de l'ADN. (Hebert et al., 2003a; Stoeckle, 2003; Stoeckle et al., 2003).

En els animals, el genoma mitocondrial sembla ser més adequat per al codi de barres que no pas el genoma nuclear, perquè el mitocondrial no té introns i molt poques vegades es recombinable. L'herència per via materna dels gens mitocondrials és també beneficiós per seguir els codis de barres (Saccone et al., 1999). No obstant això, les insercions i les delecions són comunes en aquests gens, complicant així la seqüenciació. (Doyle and Gaut, 2000).

Per les plantes i els fongs, la regió de l'ADN ribosòmic, sembla que és la millor opció per aplicar els codis de barres (Chen et al., 2010).

Hi ha 13 gens que codifiquen proteïnes mitocondrials en els animals i l'elecció de quina es vol utilitzar depèn de diferents factors. Alguns estudis previs als del codi de barres es van fer amb el gen citocrom oxidasa B, però més tard, un altre gen que es va considerar fou el citocrom c oxidasa I (COI) (el que hem utilitzat en aquest treball) (Hebert et al., 2003b). Aquest gen (COI) té àrees amb seqüències prou ben conservades i, per tant els encebadors universals desenvolupats per a aquest gen són molt robustos (Folmer et al., 1994). En comparació amb altres gens mitocondrials, el senyal filogenètic COI sembla que és millor que el de citocrom oxidasa B. La substitució d'una base en la tercera posició de nucleòtids es produeix amb una freqüència més gran del normal, la qual cosa fa que la taxa d'evolució del gen sigui bastant alta. Tot i que les variacions intraespecífiques es presenten a menys del 2% en el gen COI (Simon et al., 1994).

La utilització del codi de barres de l'ADN avui dia quasi s'ha convertit en una rutina, sobretot per la facilitat que aporta l'ús de les reaccions en cadena de la polimerasa (PCR) i la seqüenciació de Sanger. No obstant això, una nova generació de tècniques de seqüenciació s'ha desenvolupat en l'última dècada. La tècnica combina la captura d'ADN, PCR i la reacció de seqüència, i per tant podria ser molt adequada per als codis de barres de DNA.

Per donar suport a l'ús del codi de barres com a tècnica de classificar i fer que la seqüència de dades sigui més accessible per tothom, investigadors d'arreu del món treballen coordinadament en aquest camp. A més, s'ha fundat el Consorci Internacional per al codi de barres de la Vida (CBOL). Tot plegat suposa un gran esforç i la idea és aconseguir que els codis de barres d'ADN siguin un estàndard global per a la identificació biològica. Al voltant de 200 organitzacions associades de 50 països treballen junts per promoure l'ús dels codis de barres. Un dels membres d'aquest consorci és el MBI (Iniciativa de codi de barres de Mosquits) i el seu objectiu és tenir codis de barres d'ADN d'almenys 5 mostres del 80% de totes les espècies de Culicidae. BOLD és un portal de suport que proporciona als usuaris eines d'anàlisi, recursos computacionals i un emmagatzematge estructurat de dades. Les dades de codi de barres estan vinculades a la taxonomia, als llocs geogràfics i a les imatges. L'objectiu és tenir una base de dades de referència amb els registres de seqüència validats per a totes les espècies, des de tots els tàxons (Ratnasingham and Hebert, 2007).



*Logotip de Mosquito Barcoding Initiative*

Un intró és una regió del DNA compresa en la regió codificant d'un gen però que no s'arriba a expressar

## 4. ESTUDI MORFOLOGIC I MOLECULAR

### 4.1. TREBALL DE CAMP

#### 4.1.1. Introducció

El nostre estudi està centrat en els mosquits. Ens caldrà doncs primer de tot fer una acurada campanya de recol·lecció de mostres per poder desenvolupar posteriorment el nostre treball. Per recol·lectar mostres haurem d'utilitzar tècniques diferents per a les larves i per als adults.

#### 4.1.2. Material de la recol·lecció



**Trampa mosquits.** Ens serveix per caçar els mosquits de manera eficient i en gran nombre durant la nit, atraient els mosquits amb  $\text{CO}_2$  i llum.



**Gel sec.** El gel sec desprèn  $\text{CO}_2$  en sublimar-se de manera que atrau els mosquits durant la nit, per tant el necessitem per la trampa de mosquits.



**Congelador.** Per evitar que el gel sec es sublimi massa aviat, abans de col·locar-lo en la trampa perquè faci la seva funció, l'hem de mantenir en una caixa de porexpan i en el congelador, així evitem al màxim la sublimació fins al moment de col·locar-lo a la trampa.





**Pots.** En els pots guardem les larves amb alcohol.



**Pinces.** Ens serveixen per la manipulació dels mosquits, tot i que hem d'anar en compte i vigilar de no fer malbé les mostres.



**Pinzell.** Igual que les pinces ens serveix per la manipulació dels mosquits, tot i que és millor treballar amb el pinzell perquè així evitem més fàcilment de fer malbé les mostres.



**Lupa binocular.** Ens serveix per veure els mosquits amb detall i així poder classificar-los morfològicament.



**Eppendorff.** Ens serveixen per emmagatzemar els mosquits.



**Silicagel.** Són unes boletes de color blau que ens serveixen per conservar els mosquits en sec sense que es facin malbé.

Silicagel: és un polímer d'àcid silícic en forma de gra que serveix per conservar els mosquits en sec.



**Xeringa gran.** Ens serveix per agafar les larves.



**Alcohol de 80°.** Ens serveix per matar les larves i conservar-les.



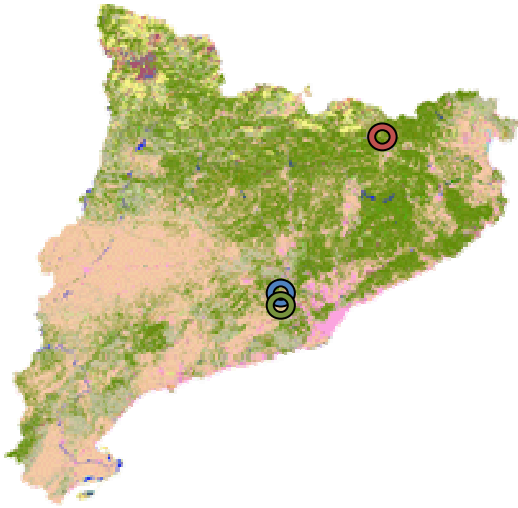
**Col·lador de tela.** Ens serveix per agafar les larves.

### 4.1.3. Mètode

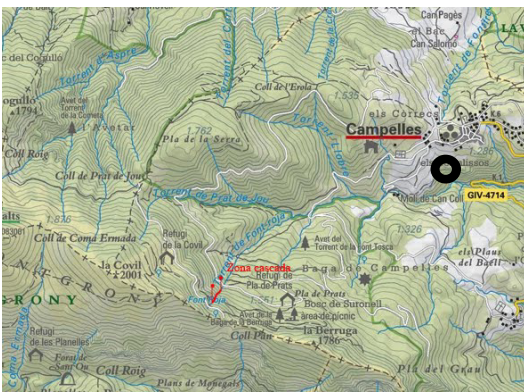
Recollirem mostres de mosquits adults i de larves per tal de poder-los classificar tant morfològicament com molecularment (seqüenciant el DNA). Per dur a terme aquesta recollecció haurem de caçar els mosquits i les larves i emmagatzemar-los degudament per assegurar una bona conservació del DNA.

Per caçar els mosquits adults i capturar les larves hem seguit tres mètodes diferents (2 per els adults i 1 per les larves).

El **mostratge** l'hem fet en 3 localitats: a alta muntanya, a Campelles (1300m), al bosc de Torrelles de Llobregat (400m) i als horts de la vora del riu Llobregat a l'alçada de Sant Vicenç dels Horts (22m) i al casc urbà de Sant Vicenç (100m) que són les localitats on hem centrat el nostre treball.



Mapa de Catalunya amb les poblacions de Campelles (vermell) Torrelles de Llobregat (blau) i Sant Vicenç dels Horts (verd) i marcades amb cercles.



Mapa de relleu de Campelles (1300m)



Mapa de Torrelles de Llobregat (400m)



Mapa de Sant Vicenç dels Horts (22-350m) amb els diferents punts on hem fet el mostreig.

### 4.1.3.1. La caça dels mosquits adults

1. Un dels mètodes més senzills de recol·lecció del **mosquits adults** és **sense utilitzar trampa**. Aquest mètode el vaig utilitzar durant els mesos previs a tenir la trampa de captura.

Consisteix en esperar durant el temps necessari que un mosquit vingui al lloc on ens trobem i un cop el mosquit deixa de volar i es para en una superfície plana, amb un pot, l'atrapem àgilment i hi col·loquem un paper perquè no escapi. Tot seguit el congelem i, un cop mort, el guardem de la manera més adequada per la seva conservació. Aquesta tècnica la vaig utilitzar amb 14 de les mostres inventariades, que corresponen, totes elles, a les recol·lectades al casc urbà de Sant Vicenç dels Horts.

És un mètode molt simple però no per això menys efectiu. Sovint és utilitzat per experts quan desenvolupen prospeccions de camp.

2. Un altre mètode és el de la captura de **mosquits adults mitjançant una trampa**. Aquest mètode el vaig dur a terme durant l'estiu 2014.

Consisteix en deixar la trampa de mosquits durant tota la nit, en el lloc d'on es volen capturar les mostres. El dia següent els mosquits es troben atrapats en la xarxa de la trampa. Pel nostre estudi vam aconseguir una trampa en préstec del Centre de Control de Mosquits.

La trampa consta d'una capsa negra on s'introdueix el gel sec i s'omple fins dalt. D'allà en penja un motoret que té un ventilador i un llum. Allà mateix s'hi enganxa, amb una goma, una xarxa on quedaran atrapats els mosquits.

La trampa funciona de la següent manera: el gel sec sublima poc a poc desprenent CO<sub>2</sub> el qual atrau els mosquits, un cop els mosquits estan a prop la trampa veuen el llum del motor i en apropar-se, el ventilador, que es troba just sota el llum, els xucla i els deixa atrapats a la xarxa.

Per preparar la trampa seguim els passos que detallem:

- Aconseguim gel sec (CO<sub>2</sub>) del Centre de Control de Mosquits el mateix dia que l'hem d'utilitzar i el guardem en una caixa de porexpan dins d'un congelador, perquè sublima molt ràpid. D'aquesta manera aconseguim reduir la velocitat de sublimació.
- Posem el gel sec a la capseta negra de la trampa.
- Anem al lloc on volem posar la trampa (bosc de Torrelles i horts al costat del riu Llobregat) i busquem una branca d'un arbre que sigui segura per penjar-la-hi.



*La trampa*



*Posem el gel sec en la capsa negra de la trampa*



*Passem la cadena de la capsa per la branca de l'arbre*

- Passem la cadena de la capsa negra per la branca de l'arbre i un cop tenim la capsa negra amb el gel sec penjada hi col·loquem el motor sota la capsa. Cordem ben fort la xarxa al ventilador del motor i engegum el motoret amb el qual s'encendrà el llum i el ventilador.
- Ho deixem funcionant tota la nit i el dia següent anem al lloc, traiem la xarxa amb molt de compte perquè no s'escapin els mosquits i els congelem juntament amb la xarxa per tal que, més tard, puguem procedir a l'emmagatzematge dels mosquits.

Amb aquesta tècnica hem recollit 10 mostres de mosquits diferents.



*Col·locació del motor i la xarxa a la capsa de la trampa*



*Recollida de la xarxa amb els mosquits dintre*

### 4.1.3.2. La captura de les larves

Per capturar **les larves** ens cal agafar un colador de tela per tal que els forats de la xarxa siguin tan prims que no hi passin les larves o bé les agafem directament amb una xeringa gruixuda, xuclant de l'aigua.

Un cop es troba un basal on s'hi veuen larves, s'introdueix en un únic moviment el colador per no moure gaire el aigua; després és renta el colador dins una cubeta amb aigua. D'allà haurem d'anar agafant, d'una en una, les larves amb l'ajut d'una xeringa. I les posem a dins d'un pot amb alcohol de 80º.

O bé s'agafen directament de l'aigua les larves amb l'ajut d'una xeringa i es posen en el pot amb alcohol de 80º intentant de posar el mínim d'aigua de la bassa per no diluir la concentració de l'alcohol.

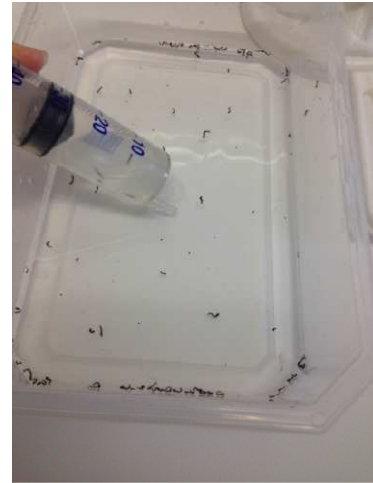
Amb aquestes tècniques vam agafar quatre pots plens de mostres d'alta muntanya (1300m) i tres pots més amb larves del bosc de Cesalpina (200m).



*Agafant les larves d'una basa amb una xeringa gruixuda (esquerra) i amb el colador (dreta).*



*Rentat del colador en la cubeta.*



*Agafem una a una les larves de la cubeta amb la xeringa o la pipeta.*



*Posem les larves de la xeringa/pipeta dins el pot amb alcohol de 80°.*

### 4.1.3.3. L'emmagatzematge

Hem utilitzat dos processos diferents per l'**emmagatzematge** dels mosquits adults i de les larves.

#### **1. Mosquits adults**

- Agafem un eppendorf i hi posem unes boletes de silicagel i un trosset de cotó fluix a sobre de les boletes.
- Posem un mosquit a l'interior de l'eppendorf i ho tanquem molt bé perquè no hi entri aire (ja que l'aire impediria l'acció del silicagel i per tant els mosquits no es conservarien).

- Retolem l'ependorf amb un número i anotem en una llibreta la correspondència del numero amb l'inventari del lloc, la població, l'altitud, la data i hi deixem un espai on indicarem l'espècie un cop l'haguem classificat.

## 2. Larves

- Cal colar les larves per llençar l'aigua de la bassa i posar-les en un pot vuit.
- Afegir alcohol al 80º de pot on hi ha les larves vives i esperar que morin.
- Traslladar les larves amb l'alcohol als eppendorff.
- Retolem els eppendorfs amb una lletra i anotem totes les dades, incloent la lletra, a l'inventari : el lloc, l'altitud, la població, la data i l'espècie, que esbrinarem més tard.



*Emmagatzematge dels mosquits amb eppendorfs*



*Mosquits emmagatzemats i etiquetats*



## 4.2. ESTUDI AL LABORATORI

### 4.2.1. Introducció

Ara ens caldrà fer un estudi molt acurat per classificar els individus (adults i larves) recol·lectats. Per això utilitzarem dos mètodes:

1.- **Mètode clàssic** de la **classificació morfològica** mitjançant claus taxonòmiques.

2.- **Mètode de classificació molecular** pel qual utilitzarem com a eina de classificació la **seqüenciació de DNA**.

El sistema clàssic de classificació taxonòmica es fa mitjançant la observació detallada de l'organisme amb l'ajut d'aparells òptics com la lupa binocular i el microscopi òptic, i claus dicotòmiques de classificació.

En ocasions, aquest sistema de classificació morfològica és insuficient i llavors ens cal recórrer a altres mètodes com el molecular. Això ens passa en espècies morfològicament molt semblants, espècies que es confonen amb facilitat i per totes aquelles identificacions de les quals no n'estiguem segurs.

### 4.2.2. Classificació morfològica

#### 4.2.2.1. Introducció

La classificació morfològica es fa mitjançant l'observació exhaustiva i detallada dels mosquits sota la lupa binocular. Un cop tenim observades totes les característiques d'una mostra es comparen amb les característiques de mosquits que ja s'han classificats anteriorment i, a més, s'utilitza un programa informàtic anomenat "The mosquitoes of Europe" per completar la identificació. Aquest programa permet identificar unes 100 espècies de Culicidae (larves, femelles i mascles adults dels gènere *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Conquillettidia*, *Ochleratus* i *Uranotaenia*).

El programa et permet una identificació intuïtiva enfocada en el multi criteri. Amb cada pas, selecciones un dels criteris proposats entre morfologia, ecologia i distribució, avançant cap a la identificació de la mostra per eleccions successives de propostes suportades mitjançant imatges i descripcions. Al final del procés, unes targetes taxonòmiques et mostren el resultat de l'espècie amb informació addicional.

Aquest és un mètode molt útil i fàcil de fer servir excepte quan ens trobem amb espècies molt semblants (pràcticament indistingibles) com *Culex pipiens* i *Culex torrentium*, per la identificació de les quals s'han d'utilitzar mètodes més complexos com la classificació molecular o bé classificar-los mitjançant l'observació dels aparells reproductors dels mosquits

mascles i femelles, cosa que es força difícil de veure i que requereix fer preparacions microscòpiques.

#### 4.2.2.2. Mètode

1. Agafem una mostra de mosquit congelat i la posem en una capsula de petri.
2. L'observem detingudament sota la lupa binocular.
3. Anem seguint les indicacions de les claus de classificació del programa informàtic ("The mosquitoes of Europe").



*Mirant mosquits en la lupa binocular per classificar-los morfològicament*

### 4.2.2.3. Descripció d'espècies identificades

Presentem el catàleg d'espècies que hem identificat ordenades per subfamílies i en ordre alfabètic. De cada espècie indiquem la localitat on ha estat recol·lectada i el nombre d'individus inventariat en relació al total.

A continuació explicarem les característiques més destacades de les espècies; ordenades alfabèticament pel nom genèric. De cada espècie en ressaltem l'ecologia, la distribució i els trets diferencials més característics.

#### *Aedes*

1. *Aedes aegypti*
2. *Aedes albopictus*

#### *Anopheles*

3. *Anopheles antroparvus*

#### *Culicidae*

4. *Culex impudicus*
5. *Culex pipiens*
6. *Culex torrentium*

#### *Culiseta*

7. *Culiseta longiareolata*

#### *Ochlaratus*

8. *Ochlaratus caspius*

***Aedes aegypti*:**

*Aedes aegypti*  
Imatge extreta de Bold System

Només hem trobat larves d'aquest mosquit ampliant la nostra àrea d'estudi cap a Sant Boi, concretament unes 22 larves (10% del total). A Sant Vicenç no n'hem trobat.

Es troba en totes les regions del món que tenen una temperatura mitjana anual superior a 20°C, cosa que es correspon amb nombroses regions. Aquesta espècie no té una diapausa hivernal i per tant no està adaptada a les regions fredes. Les poblacions que es troben en el límit de l'àrea de distribució de l'espècie són força inestables, d'altra banda a causa del control sistemàtic que s'ha fet d'aquesta espècie, l'eradicació, en la majoria dels països europeus, s'ha pogut aconseguir fàcilment.

L'espècie però encara es pot trobar en gairebé tots els països de la Mediterrània, especialment en els ports on l'espècie es va introduir a través de la navegació comercial. A Grècia les observacions d'aquesta espècie són una mica més sovintejades.

Els ous són dipositats a la superfície de l'aigua i la seva incubació dura 4 dies. L'ou és resistent a la dessecació i es pot mantenir viable entre aquest interval de temperatura: 46°C/-17°C.

La seva estructura superficial és semblant a la de l'*Aedes albopictus*.

***Aedes albopictus***

Mosquit adult de *Aedes albopictus*  
 Imatge extreta de Bold System (esquerra)

Larva de *Aedes albopictus*  
 Imatge d'Andrea Rubio (dreta)

**MOSQUIT TIGRE**

L'hem trobat a la zona urbana de Sant Vicenç dels Horts en una proporció del 3% .

És conegut com el mosquit tigre. És una espècie que pertany a la família *Culicidae*. Es caracteritza per la seva coloració negra amb ornamentació blanca al tòrax i l'abdomen, potes amb bandes negres i blanques i una conspícua línia blanca longitudinal central al tòrax i al cap. Té una longitud d'entre uns 5 i 10 mm. La seva adaptació a petits vivers artificials fets per l'home, a més de la seva resistència al fred dels ous i a la dessecació, ha fet possible el seu transport a tot el món en contenidors de pneumàtics usats o d'altres. Tot i que la seva reproducció està limitada per diferents factors com el fotoperíode, la temperatura, les precipitacions i la humitat, la seva gran plasticitat li permet adaptar-se a una gran varietat d'entorns, des d'àrees boscoses, a llogarets rurals i fins a ecosistemes urbans. Tant a les zones tropicals com a les regions temperades s'hi mantenen amb l'ajut de la diapausa hivernal dels ous. Fins i tot, després de la seva transferència a una nova regió, *A. albopictus* conserva la capacitat de colonitzar els forats dels arbres. Aquest mosquit d'origen asiàtic, és propens a ampliar l'àrea de distribució, sobretot des dels anys 70. Avui dia, no coneixem cap continent que no en tingui. A Europa, la presència d'aquest mosquit s'ha registrat des de fa pocs anys. Primer a Albània i Itàlia, on l'espècie ja està fermament implantada, i més recentment a França i Bèlgica. També s'ha escampat a la resta de països. Cal vigilar les poblacions perquè, tal i com hem dit abans, pot ser transmissor d'algunes malalties.

***Anopheles antroparvus***

*Anopheles antroparvus*  
Imatge extreta de Google  
imatges (esquerra)

*Anopheles antroparvus*  
Imatge d'Andrea Rubio  
(dreta)



No l'hem localitzat al Baix Llobregat ni a alta muntanya. Només en tenim una mostra (7% del total) recol·lectada del Delta del Ebre (que no forma part del nostre estudi).

És una espècie que té una diapausa incompleta, quan les condicions són favorables les femelles poden romandre actives durant l'hivern. La distribució de l'espècie inclou la major part d'Europa, exceptuant l'extrem sud-est i les regions al nord de latitud 57<sup>º</sup>N.

És extremadament difícil identificar morfològicament els mascles adults. Tot i que és complexa l'observació dels ous pot arribar a ser útil per una identificació. Sempre però es recomana estudiar un gran nombre d'individus de la mateixa població. Per poder tenir la identificació amb prou garanties, sovint es requereix un estudi genètic.

***Culex impudicus***

Mosquit adult de  
*Culex impudicus*  
Imatge extreta de  
Google imatges  
(esquerra)

Larva de *Culex*  
*impudicus*  
Imatge d'Andrea  
Rubio (dreta)



Només l'hem trobat a alta muntanya (1300m) a Campelles. En una mateixa mostra hi havia tant *Culex impudicus* com *Culiseta longiareolata*, de *Culex impudicus* n'hi havia un 9% del total.

Es troba en etapa larval des de començament de primavera fins a la tardor. Les femelles ponen els ous a l'hivern, en buits naturals com coves o altres cavitats i, en tornen a pondre a la primavera. És una espècie mediterrània i la seva àrea de distribució s'estén cap a l'est fins a l'Iran. Les larves són morfològicament molt semblants a les de *Culex territans*. Les larves viuen en aigües clares, fresques i ombrejades. Sovint les troben al llarg de rierols ombrejats, de vegades en els camps d'arròs, trinxeres cobertes d'herba i llacunes temporals. D'una banda, per la poca presència d'aquest mosquit i, de l'altre, per les seves preferències alimentàries, mai no és responsable de la transmissió de malalties parasitàries en éssers humans.

***Culex pipiens***

*Culex pipiens*  
Imatge extreta de "the  
mosquito of Europe"  
(esquerra)

*Culex pipiens*  
Imatge d'Andrea Rubio  
(dreta)

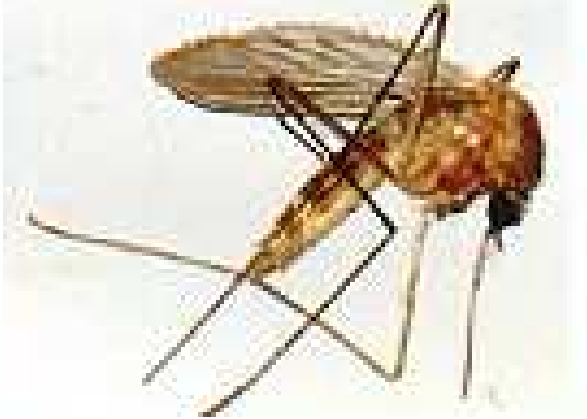
**MOSQUIT COMÚ**

Ha estat l'espècie més trobada durant la recerca ja que és el mosquit més comú. N'hem trobat dintre de la zona urbana (Sant Andreu de la Barca, Viladecans, el Prat i Sant Vicenç dels Horts) en un 17%. També n'hem trobat, a la muntanya de Torrelles de Llobregat (400m) un 11% de mascles *Culex pipiens* i un 4% de femelles. A l'hort n'hem trobat només un 2%. I a alta muntanya, a Campelles (1300m), hi hem trobat un 17% de larves del total, que podien ser tant *Culex pipiens* com *Culex torrentium*. Però com que amb mètodes clàssics no es poden distingir aquestes dues espècies perquè són molt semblants, hem utilitzant tècniques moleculars per fer-ho. Vam seqüenciar 8 mostres de les quals una era *Culex pipiens* i dues *Culex torrentium*, les altres no les vam poder seqüenciar completament.

També anomenat mosquit comú, és una espècie de mosquit de la família *Culicidae*. Arreu del món és causant o transmissor de moltes malalties com la encefalitis japonesa, la meningitis i la urticària i, a Estats Units, es transmissor també del virus del Nil occidental. Aquesta espècie té una enorme plasticitat ecològica i morfològica, les seves variacions morfològiques han originat moltes descripcions de formes diferents, les quals no són genèticament aïllades sinó que són el resultat d'una selecció ecològica. Presenta una gran variabilitat d'aquests caràcters d'acord amb la latitud i la temporada en la que es capturin. Les larves de *Culex pipiens* apareixen a mitjans de primavera i desapareixen amb les primeres gelades però els adults són abundants durant l'estiu i la tardor. Aquesta espècie es troba a Amèrica i Europa.



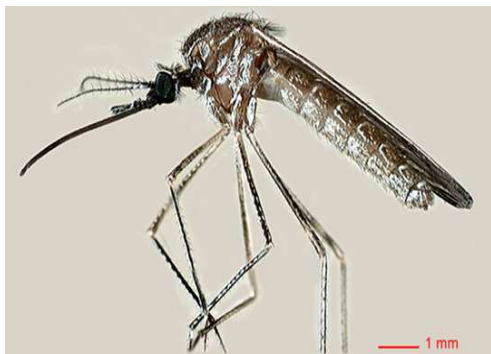
### *Culex torrentium*



*Culex torrentium*  
Imatge extreta de Google imatges (esquerra)

Ha estat una espècie que només hem trobat a alta muntanya, a Campelles (1300m). Del total de larves que hem recol·lectat un 17% podien ser tant *Culex pipiens* com *Culex torrentium*. Però com que amb la classificació morfològica no es podien distingir semblants hem hagut d'utilitzar tècniques moleculars per fer-ho. Vam seqüenciar 8 mostres de Campelles de les quals dues les vam identificar com *Culex torrentium* i una com a *Culex pipiens*, la resta no van ser seqüenciades correctament.

És una espècie paleàrtica, la trobem al nord i centre d'Europa. En les seves etapes aquàtiques es poden trobar a molts llocs diferents de reproducció, incloent forats de roques, piscines al llarg dels torrents, bassals d'aigua i vores de llacunes o hàbitats artificials com barrils i contenidors. L'aigua pot ser dolça o salada, molt bruta o neta, i fins i tot, rica en òxid de ferro; els llocs on es multiplica són generalment petits, oberts i prop del bosc. Sovint es troba a l'aigua amb *C. pipiens* però a diferència de *C. pipiens*, *C. torrentium* s'adapta a les temperatures de l'aigua més baixes i domina en les regions fredes o en altituds més grans. A més *C. torrentium* és l'única espècie de *Culex* que viu en forats naturals dels arbres naturals. Els ous són dipositats a la superfície de l'aigua i les larves són presents durant l'estiu, des de la primavera fins a principis de tardor. Cal dir que el desenvolupament de les larves sembla ser més lent que en *C. pipiens*. Els adults són presents durant l'estiu fins a les primeres gelades i s'han observat mosquits adults alimentant-se de nèctar de les flors, sobretot a la nit. Les femelles transmeten el virus Sinbis.

***Culiseta longiareolata***

*Culiseta longiareolata*  
Imatge extreta de "the  
mosquito of Europe"  
(esquerra)

*Culiseta longiareolata*  
Imatge d'Andrea Rubio  
(dreta)



N'hem recol·lectat un 6% al bosc de Cesalpina (Torrelles de Llobregat) i 5% a la zona urbana (Sant Vicenç dels Horts). A més, com ja hem dit anteriorment, en una mostra d'alta muntanya, Campelles (1300m), d'entre les 33 larves recol·lectades n'hi havia tant de *Culex impudicus* com de *Culiseta longiareolata*, d'aquesta última un 8%.

Mostra un desenvolupament continu en els països càlids, però pot presentar una diapausa hivernal en les larves de les regions temperades i en les femelles de les regions fredes. Trobem adults al llarg de tot l'any amb la màxima densitat a la primavera i la tardor. Les femelles són monògames i autògenes. Aquesta espècie és present en les regions paleàrtiques, orientals i afro-tropicals del sud. A Europa, és comuna als països mediterranis com Espanya. Registres esporàdics mostren que en ocasions es troba al nord de França i al Regne Unit.

Ponen uns grupets d'ous que queden enganxats a la superfície d'aigües tranquil·les. Els llocs de reproducció són molt variats (piscines, abeuradors, pous abandonats, buits de roques, estanys, arrossars, canals), on l'aigua sempre està estancada i generalment rica en matèria orgànica. Aquests viviers poden tenir caràcter permanent o temporal, ja sigui a l'ombra o al sol, amb aigua dolça o salada, amb aigua neta o contaminada. Aquesta àmplia gamma d'hàbitats explica l'àmplia distribució i abundància d'aquesta espècie.

*Ochleratatus caspius*



*Ochleratatus caspius*  
Imatge extreta de "the  
mosquito of Europe"  
(esquerra)

*Ochleratatus caspius*  
Imatge d'Andrea Rubio  
(dreta)



N'hem recolectat un 5% a la zona urbana (Sant Vicenç dels Horts) i un 1% a la zona propera al riu, els horts de Sant Vicenç.

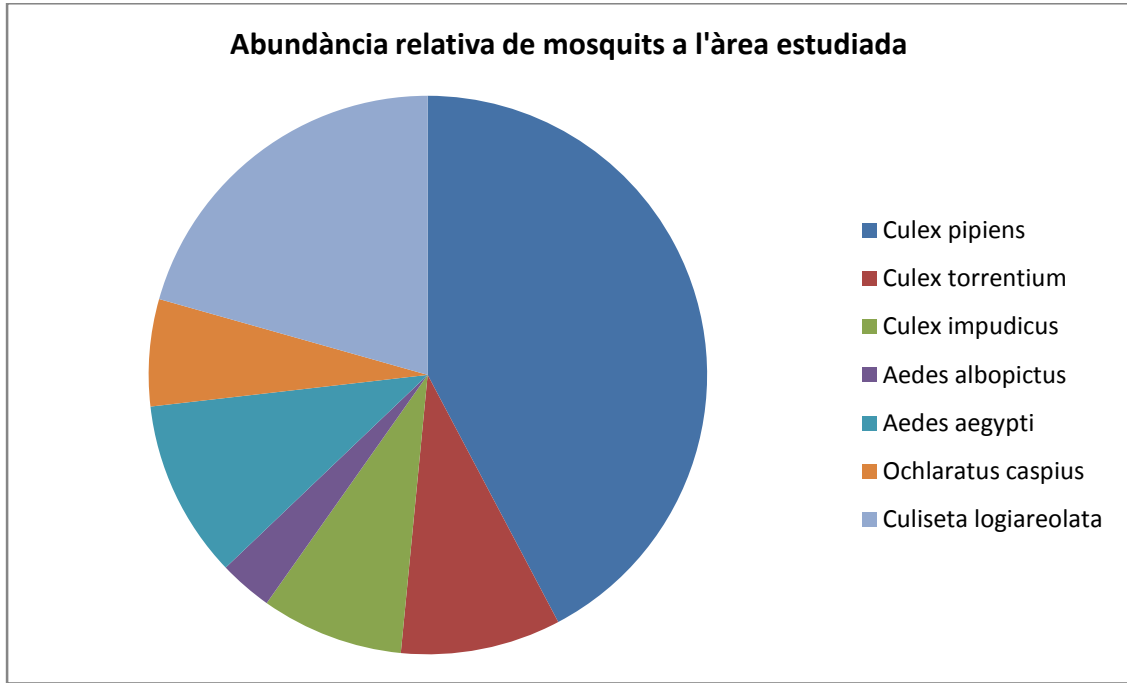
És una espècie de mosquit de la família *Culicidae* que inclou dues subespècies: *O. caspius meira* i *O. caspius caspius*, aquest últim es troba a Europa. *Oc. caspius* passa l'hivern en estat d'ou. A les regions càlides els adults viuen durant tot l'any, però són més abundants a la primavera, després que hagi augmentat la temperatura de l'aigua i que s'hagi allargat el fotoperíode. Les femelles produeixen una gran quantitat d'ous.

#### 4.2.2.4. Abundància relativa i distribució a l'àrea d'estudi

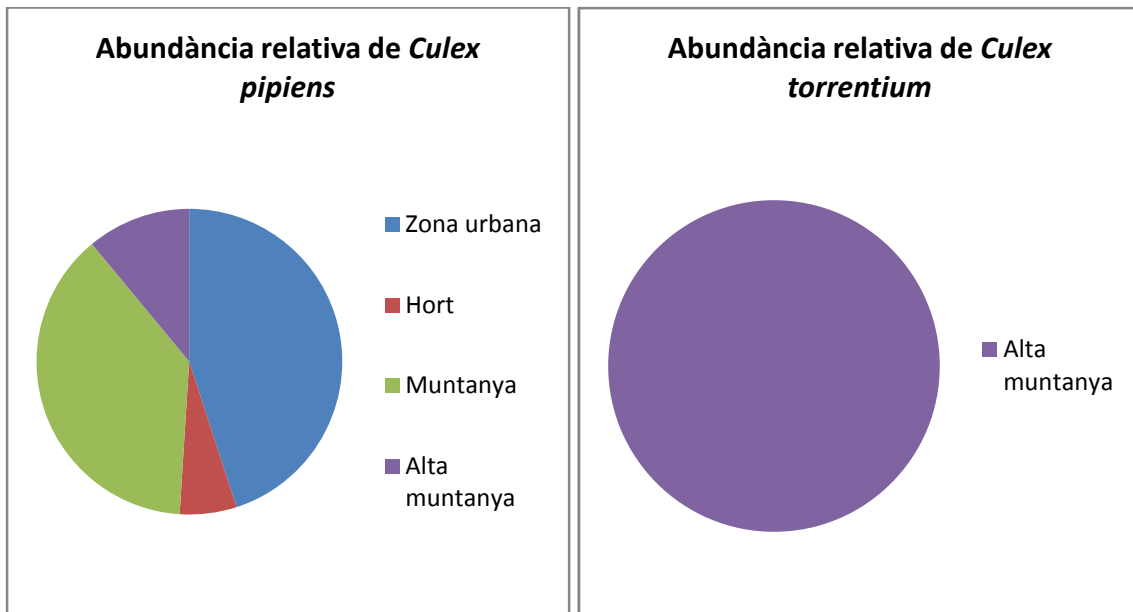
A continuació presentem una taula de dades en què es veu l'abundància relativa i la distribució en l'àrea d'estudi de les espècies recol·lectades. Podem observar el percentatge en què es troba cada espècie d'entre el total d'espècies estudiades a totes les àrees i més concretament podem veure quina és l'abundància de cada espècie en les diferents zones. A més, en el cas del *Culex pipiens* que hem trobat a la muntanya de Torrelles podem veure l'abundància relativa entre mascles i femelles.

L'espècie més freqüent i més àmpliament repartida és *Culex pipiens*, el mosquit comú, ja que el trobem a tot arreu, des de terra baixa fins a alta muntanya, i amb una alta proporció. Cal observar però que a alta muntanya, una part dels *Culex pipiens* són substituïts per un altra espècie molt pròxima, el *Culex torrentium* que ocupa el mateix nínxol ecològic. Fenomen idèntic al que observem a Europa central, així doncs aquestes espècies de mosquits segueixen una distribució latitudinal que s'avé perfectament amb la distribució altitudinal. La resta d'espècies les trobem sobretot a la zona urbana excepte *Ochlaratus caspius* que el trobem també a l'hort. *Culiseta longiareolata* és tan abundant a terra baixa com a muntanya mitjana com a alta muntanya. *Culex torrentium* i *Culex impudicus*, per contra, els trobem únicament a alta muntanya. Cal afegir que a alta muntanya trobem en major proporció el *Culex torrentium* que el *Culex pipiens* ja que a mesura que l'altitud augmenta la proporció de *Culex torrentium* també.

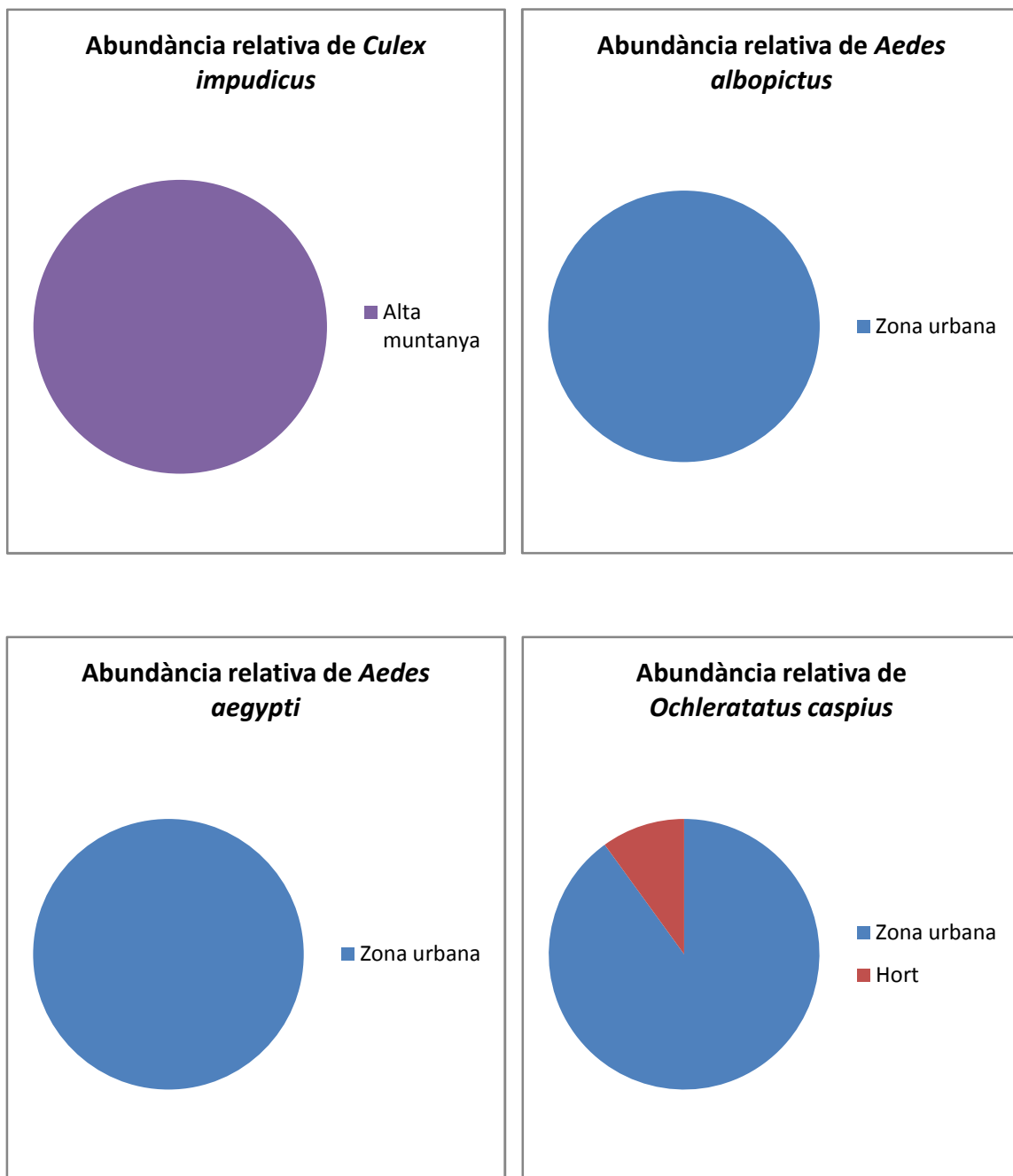
Espècies de mosquits	% Espècie	Zona urbana (Baix Llobregat)	Hort (prop del riu)	Muntanya (400m)	Alta muntanya (1300m)	
<i>Culex pipiens</i>	41%	45%	6%	38%		100%
<i>Culex torrentium</i>	9%				100%	100%
<i>Culex impudicus</i>	8%				100%	100%
<i>Aedes albopictus</i>	3%	100%				100%
<i>Aedes aegypti</i>	10%	100%				100%
<i>Ochleratatus caspius</i>	6%	90%	10%			100%
<i>Culiseta longiareolata</i>	20%	31%		32%	37%	100%
<b>TOTAL</b>	100%					



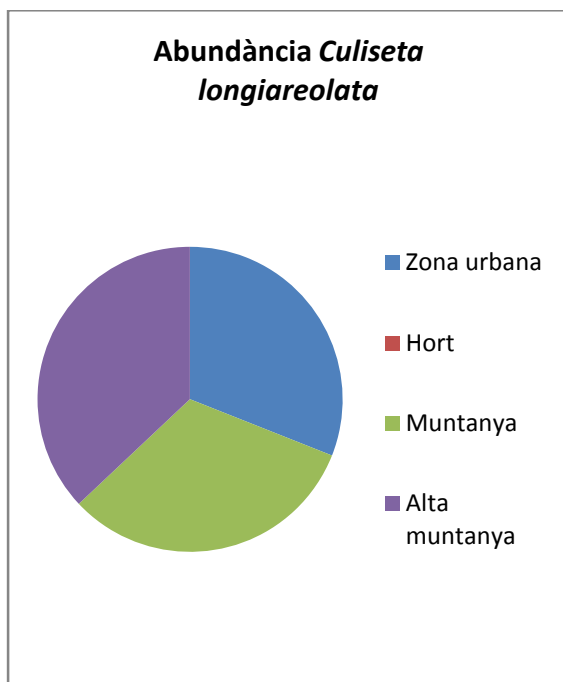
El mosquit més abundant és, clarament, el mosquit comú. En canvi el mosquit tigre que pot arribar a ser tan molest, ens adonem que no és, ni de bon tros, tan abundant.



El mosquit comú veiem que és molt abundant a la terra baixa, tant a les zones urbanes com a les muntanyoses. En canvi, baixa molt la seva presència a alta muntanya. En canvi, *Culex torrentium* només el trobem a alta muntanya.



*Culex impudicus* el trobem únicament a alta muntanya. En canvi, *Aedes albopictus* i *Aedes aegypti* els trobem només a les zones urbanes. D'altra banda, *Ochlaratus caspius* el trobem a zona urbana en major proporció però també en els horts.



*Culiseta longiareolata*, en canvi, la trobem en proporcions molt semblants en qualsevol habitat.

#### 4.2.2.5. Comparació amb altres estudis

Aquest estudi ens mostra les espècies de mosquits recol·lectades a Huelva, Barcelona, Tarragona i Girona. Entre el 2001 i el 2005, així com el nombre absolut d'individus inventariats i les dades relatives en %. Podem veure que a tota l'àrea estudiada hi trobem sobretot *Ochlerotatus caspius* en un 41%, en canvi, *Culex pipiens* és abundant però no ho és tant ja que n'hi ha un 32% en el total. D'entre les altres espècies estudiades trobem *Anopheles atroparvus* en un 7% i *Aedes albopictus* i *Culiseta longiareolata* en menys d'un 1%.

El fet que *Ochlerotatus caspius* sigui més abundant només ho veiem a Huelva i Tarragona, zones més al sud. En canvi, a Barcelona, on queda inclosa la nostra àrea d'estudi, i a Girona, hi trobem més *Culex pipiens* que *Ochlerotatus caspius* en un tant per cent elevat. Per exemple, a Barcelona trobem *Culex pipiens* en un 91% mentre que *Ochlerotatus caspius* el trobem únicament en un 7%. Si ho comparem ara amb els resultats que hem obtingut en la nostra àrea d'estudi ens adonem que trobem una distribució i una abundància relativa molt semblant. A més, a Girona hi trobem també més *Culex pipiens* però en menys proporció que a Barcelona, exactament en un 52% respecte un 16% d'*Ochlerotatus caspius*. Tot i no estar inclòs en el nostre estudi, gràcies a aquestes dades, veiem que a menys latitud disminueix el nombre de *Culex pipiens* i, en canvi, augmenta el d'*Ochlerotatus caspius*.

Les altres dues espècies *Aedes albopictus* i *Culiseta longiareolata*, igual que en el nostre estudi, es troben en menys proporció. A les dades anteriors caldria afegir una nova espècie, *Culex*

*torrentium*, que nosaltres hem pogut inventariar a Campelles (1300m), Pirineu gironí. Es troba en més baixa proporció que *Culex pipiens* però no gens menyspreable.

Així doncs amb el nostre estudi corroborem les dades anteriors (2001-2005) i hi afegim una nova troballa (*Culex torrentium*). Una espècie, d'altra banda, que, fins ara, havia estat trobada a Europa central i del nord.

2001+2002+2003+2004+2005	Huelva	%	Barcelona	%	Tarragona	%	Girona	%	Complete Area	%
Species	Mosquitoes		Mosquitoes		Mosquitoes		Mosquitoes		Mosquitoes	
<b><i>Culex pipiens</i></b>	8.425	20,54	6.347	90,68	393	4,48	8.396	52,13	23.561	32,32
<i>Cx. theileri</i>	6.672	16,26	0	0,00	0	0,00	1.266	7,86	7.938	10,89
<i>Cx. modestus</i>	95	0,23	1	0,01	3.240	36,96	0	0,00	3.336	4,58
<i>Cx. perexiguus</i>	47	0,11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	47	0,06
<b><i>Culiseta longiareolata</i></b>	54	0,13	359	5,13	1	0,01	0	0,00	414	0,57
<i>Cs. annulata</i>	42	0,10	0	0,00	0	0,00	14	0,09	56	0,08
<i>Cs. subochrea</i>	1	0,00	4	0,06	0	0,00	0	0,00	5	0,01
<i>Culiseta sp.</i>	1	0,00	2	0,03	0	0,00	0	0,00	3	0,00
<i>Aedes vexans</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	427	2,65	427	0,59
<b><i>Ae. albopictus</i></b>	0	0,00	15	0,21	0	0,00	0	0,00	15	0,02
<b><i>Ochlerotatus caspius</i></b>	22.910	55,85	260	3,71	4.092	46,68	2.556	15,87	29.818	40,91
<i>Oc. detritus</i>	1.714	4,18	0	0,00	0	0,00	66	0,41	1.780	2,44
<i>Oc. pulcritarsis</i>	0	0,00	5	0,07	0	0,00	0	0,00	5	0,01
<i>Oc. geniculatus</i>	2	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,00
<i>Coquillettidia richiardii</i>	113	0,28	2	0,03	6	0,07	0	0,00	121	0,17
<b><i>Anopheles atroparvus</i></b>	517	1,26	0	0,00	1.035	11,81	3.294	20,45	4.846	6,65
<i>An. maculipennis</i>	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,01	1	0,00
<i>An. algeriensis</i>	100	0,24	0	0,00	0	0,00	0	0,00	100	0,14
<i>An. plumbeus</i>	9	0,02	2	0,03	0	0,00	0	0,00	11	0,02
<i>An. claviger</i>	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,00
<i>Anopheles sp.</i>	0	0,00	2	0,03	0	0,00	86	0,53	88	0,12
<i>Culex sp.</i>	319	0,78	0	0,00	0	0,00	0	0,00	319	0,44
<b>Total</b>	41.023	100,00	6.999	100,00	8.767	100,00	16.106	100,00	72.895	100,00

Dades facilitades per Carles Aranda del Centre de Control de Mosquits



## 4.2.3. Classificació molecular: seqüenciació del DNA

### 4.2.3.1. Introducció

Per començar volem fer esment al fet que per treballar al laboratori cal ser molt curós i metòdic. Durant tot el temps que hem treballat en el laboratori hem portat bata i guants en tot moment, a més de portar els cabells recollits, i de no portar polseres, ni penjolls, ni arracades per tal de no contaminar les mostres. A més també cal dir que no hem de portar lentilles, ni sandàlies, ni pantalons curts per motius de seguretat.

Cal dir també que durant tot el procés hem seguit uns protocols molt estrictes i hem etiquetat totes les mostres molt escrupolosament per tal d'identificar posteriorment cada mostra amb la seqüència de DNA corresponent, evitant així possibles errors.

Poden semblar detalls molt evidents o, fins i tot, banals però en un treball de laboratori i, especialment, amb el material amb que hem treballat, són molt importants, sobretot a l'hora d'assegurar uns bons resultats.

Els protocols que hem estat utilitzant són de "Canadian Centre for DNA Barcoding", de "UPF Genomic Core Facility" i de "QIAGEN" i el material utilitzat ha estat dels kits de "QIAGEN".

### 4.2.3.2. Plantejament de l'estudi

Sabem que *Culex pipiens* és la espècie de mosquit més comuna a les nostres contrades però a mesura que pugem cap Europa central i la latitud augmenta, el nombre de *Culex pipiens* disminueix progressivament i augmenta, per contra, la proporció de *Culex torrentium*. Tenint en compte això, vam pensar que a les mostres d'alta muntanya també es produiria aquesta progressió, i hi trobaríem més *Culex torrentium* que *Culex pipiens*.

Així doncs, aquesta va ser la **hipòtesi** que ens vam formular, creïem que si aplicàvem l'estudi molecular del DNA podríem descobrir una presència de *Culex torrentium* que no trobaríem a terra baixa. I que, d'altra banda, amb una simple observació morfològica ens podia passar desapercibuda.

Amb la seqüenciació del DNA intentaríem distingir entre dues espècies morfològicament molt semblants com *Culex pipiens* i *Culex torrentium*.

### 4.3.3.3. Material del laboratori



**Bata i guants.** Ens serveixen per la nostra seguretat però sobretot per no contaminar les mostres.



**Micropipetes:** p1000 (200-1000 $\mu$ l), p200 (20-200 $\mu$ l), p20 (2-20 $\mu$ l), p2 (0,1-2 $\mu$ l). Ens serveixen per agafar quantitats molt petites amb molta precisió.



**Puntes** blaves (grans), grogues (mitjanes) i liles (petites). Per agafar les quantitats precises amb les micropipetes. Cada cop que n'utilitzem una, la llencem i n'agafem una altra per no contaminar cap mostra. Són d'un sol ús.



**Eppendorf o tubs centrifugadors, tubs PCR i Dneasy Mini Spin Column.** Tub de polipropilè que aguanten temperatures molt baixes i que ens serveixen per mantenir substàncies a dins.

Eppendorf: o tub de microcentrífuga, contenidor cilíndric de plàstic, amb un fons cònic i una tapa unida al seu cos.

Dneasy Mini Spin Column: contenidor que consta de dues parts: un tub amb fons rodó i una tapa amb un filtre.



**Portatubs.** Ens serveixen per aguantar els eppendorffs mentre manipulem les pipetes o altres materials del laboratori.



**Caixa de porexpan i gel.** Els utilitzem quan treballem amb el DNA i el material de la PCR ja que així no es fa malbé res gràcies a la conservació en fred.



**Brossa biològica.** La utilitzem per llençar el material de laboratori i no contaminar la brossa ordinària amb material com ADN o productes químics.



**Retolador permanent, llibreta i bolígraf.** És importantíssim prendre nota de tot el que fem i marcar molt bé les mostres per evitar alteracions en el resultats per un mal procediment.



**Mostres de mosquits adults i larves.** Per fer l'extracció de DNA abans haurem de tenir les mostres ben conservades de mosquits i larves.

Diferents aparells de laboratori:



**Vortex.** Aparell que ens serveix per barrejar la mostra uns segons per tal que el líquid que conté quedi a la punta del eppendorf o per tenir una mescla homogènia.



**Centrifugadora.** Aparell que serveix per barrejar el contingut del eppendorf mitjançant una centrifugació durant un temps i a unes revolucions determinades.



**Balança d'alta precisió.** Aparell que serveix per pesar coses amb pes molt petit com per exemple els mosquits.

Vortex: aparell que mitjançant vibracions crea un flux giratori en el líquid de l'eppendorf. Així que quan fem un vortex volem dir que remenem mitjançant aquest aparell.



**Incubadora.** Aparell que serveix per escalfar les mostres dels eppendorffs a la temperatura desitjada.



**PCR.** Aparell que serveix per obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment d'ADN específic, a partir d'una quantitat mínima de mostra.



**E-gel i gel doc.** Aparells que serveixen per fer les electroforesis per comprovar la quantitat de DNA que conté la mostra.



**Nanodrop.** Aparell que serveix per mirar la quantitat de DNA que hi ha la mostra mitjançant unes corbes i unes quantitats de ng/ $\mu$ l.



**Material del kit de QIAGEN** (buffers, etanol, instruments per triturar...) que trobem descrit en el protocol i que ens serveix per l'extracció, la purificació i per la PCR.

#### 4.3.3.4. Mètode

Les etapes que cal seguir, per aconseguir la seqüenciació del DNA i la classificació taxonòmica de les mostres són les que descrivim a continuació:

- **Recol·lecció d'ADN:** recollim mostres d'adults i larves seguint el protocol que hem detallat anteriorment (pàg. 15) i les conservem molt acuradament per assegurar la conservació del ADN (els adults en sec en silicagel i les larves en alcohol de 80%).
- **Extracció de ADN:** primerament es fa la lisis cel·lular, és a dir, es trenquen les cèl·lules però es conserven els nuclis intactes. Per cèl·lules animals s'utilitzen mètodes químics (amb solucions alcalines). Per cèl·lules vegetals es fan servir mètodes físics. Tot seguit eliminem lípids i tots mena de residus mitjançant detergents i centrifugació per obtenir, finalment, un DNA pur i d'alta qualitat sense cap contaminant.

El primer científic que va començar a treballar amb aquestes tècniques va ser Misher (1844-1895). A més fou el primer en identificar el DNA dels leucòcits. I com a mostres feia servir les cèl·lules que recollia del pus que s'acumulava a les venes dels malalts.

- **Amplificar (fer còpies) del gen (PCR).** Per fer això cal::
  - DNA motlle
  - Nucleòtids di fosfatats
  - Encebadors o també anomenats primers que són d'uns vint parells de bases que aguanten molt bé la temperatura i que són molt específics per la seqüència que desitgem amplificar ja que cada seqüència té el seu primer.
  - La DNA polimerasa que és un enzim. En aquest cas utilitzem la Taq. polimerasa que aguanta molt bé la temperatura sense fer-se malbé i que s'extreu de un bacteri anomenat *Termophilus aquatilis* que viu en fons termals marins.
  - Solució isotònica
  - Termociclador

- **Electroforesi:** ens permet veure si el DNA s'ha replicat bé. Això funciona de la següent manera: el DNA es desplaça cap el pol positiu ja que té càrrega negativa. El gel d'agarosa és porós de manera que el DNA es desplaça pels poros del gel, així els fragments més petits corren més que els grossos. Un cop el desplaçament del DNA ha acabat identifiquem els nostres fragments comparant-los amb uns marcadors de nombre de parells de bases nitrogenades conegudes (*leaders*), així podrem saber quants parells de bases nitrogenades té el nostre fragment.
- **Purificació d'ADN:** netegem la nostra mostra eliminant els primers, el DNA motlle, la polimerasa, els dNTPs i la solució iònica. Això ho fem utilitzant solucions alcohòliques.
- **Espectrofotometria o nanodrop:** aquesta tècnica ens informa de la puresa de la mostra mitjançant un feix de llum que passa a través de la mostra. Si passa poca llum hi ha molta absorció i per tant hi ha molta concentració de mostra. Una absorbència de 260nm pels àcids nucleics i 280 nm per les proteïnes. Un quocient 260/280 de 1,8-2 ens indica bona puresa de DNA
- **Seqüenciació de l'ADN:** seqüenciar vol dir llegir el DNA i posar les bases nitrogenades en ordre.

Maxen i Gilbert van fer la primera seqüenciació química, per trencament químic de la cadena amb enzims el 1977. Era, però, un mètode molt lent.

Sanger va utilitzar dideoxinucleòtids el 1981, la qual cosa suposà un avenç molt important. La seqüenciació automàtica que incorpora fluorocroms associats a cada base nitrogenada (una base de cada color) amb les quals podrem llegir 10 milions de bases per dia s'aconseguí cap el 1990.

- **Tractament bioinformàtic de les dades:** utilitzem programes informàtics amb bases de dades molt grans per analitzar les seqüències obtingudes.

## Detall del procés al laboratori.

### 1. Extracció de ADN

- Pesem, en principi, 25 mg de mostra a la balança d'alta precisió. Mirem què pesen els nostres mosquits: 1 mosquit (0,9 mg) i 4 mosquits (4mg). Com que no sabem si obtindrem uns resultats més bons amb un mosquit o amb quatre continuem endavant amb totes dues mostres. En les pròximes anàlisis ho valorarem i decidirem.



*Mostres de 1 mosquit i de 4 mosquits preparades per pesar-les a la balança d'alta precisió.*

- Posem els 4 mosquits en un eppendorf i 1 mosquit sol en un altre eppendorf i deixem els eppendorfs en el porta tubs.
- Posem en ambdues mostres 180µl de buffer ATL amb la pipeta p1000.
- Trinxem les mostres amb un triturador manual.
- Afegim a les mostres 20µl de proteïna k amb la micro pipeta p20.
- Fem un *vortex* amb les mostres.

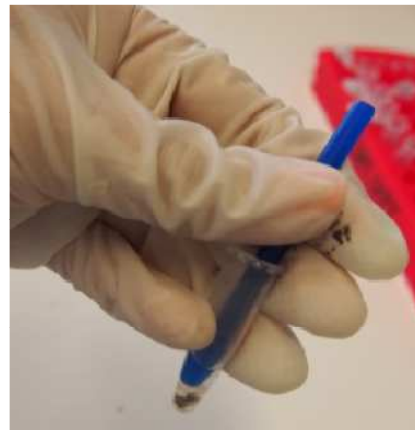
Buffer: dissolució o solució esmorteidora del pH.

ATL: és un tampó de lisi de teixit que s'utilitza en la purificació d'àcids nucleics.





*Mostres de 1 i de 4 mosquits en els eppendorfs retolats.*



*Triturem els mosquits que es troben en contacte amb l'ATL.*



*Eppendorf amb un a quatre mosquits triturats juntament amb l'ATL i la proteïna K*

- Posem les mostres a la incubadora a 56°C tota la nit, la incubadora la posem en el programa de *mix* (barreja) perquè les mostres es remenin alhora que s'escalfen.
- Traiem les mostres de la incubadora i fem un *vortex* (remenem) durant 15 segons.
- Afegim a ambdues mostres 200µl de buffer AL amb la pipeta p1000.
- Tornem a fer un *vortex* durant 15 segons.
- Afegim 200µl d'etanol (96-100%) amb la pipeta p1000.
- Una altra vegada fem un *vortex*.
- Pipetegem el contingut de les mostres i el posem en un D-Neasy Mini Spin Column.

AL: tampó de lisi que s'utilitza durant l'aïllament d'ADN.



Mostres a la incubadora a 56°C i 300rpm



Vortex posterior a la incubadora.



Pipetejant les mostres (imatge de la esquerra) en el D-Neasy Spin Column (imatge de la dreta).



- Posem les mostres a la centrifugadora a 8000rpm durant 1 minut.
- Tirem el tub collection amb el líquid restant a les escombraries biològiques i col·loquem a l'spin column un altre tub collection.
- Afegim als spin column de les dues mostres 500µl de buffer AW1 i centrifuguem durant 1 minut a 8000 rpm.
- Llencem a les escombraries biològiques els tubs collection amb el líquid restant i en posem de nous.

Tub collection: tub amb el fons arrodonit del Dneasy Spin Column.

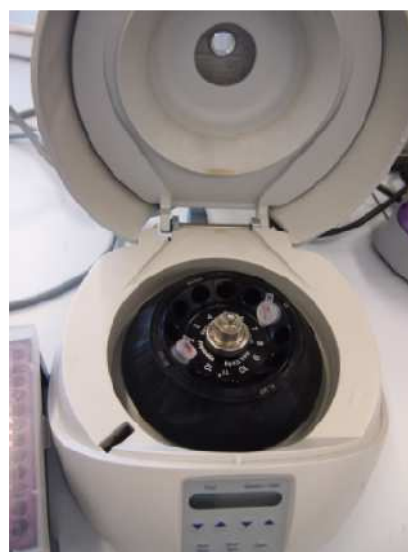
Buffer AW1: és una solució de rentat rigorós a base d'etanol.

Buffer AW2: solució d'etanol que serveix per rentar les sals que hi ha presents.

- Afegim 500µl de buffer AW2 i centrifuguem durant 3 minuts a 14000rpm.
- Un altre cop, llencem el tub collection i en posem un altre i hi afegim 200µl de buffer AE.
- Deixem reposar les dues mostres a temperatura ambient durant 1 minut i centrifuguem les mostres durant 1 minut més a 8000 rpm.
- Ara anem al nanodrop o spectrophotometer per fer un control de la quantitat de DNA en ng/µl d'ADN de les mostres.
  - Posem 1µl de l'últim buffer utilitzat, en aquest cas el buffer AE, sobre l'òptic del nanodrop per fer un *blank* (control) i així posar la maquina a 0 ng/µl.



Posant 1µl de la nostra mostra amb la micropipeta en l'òptic.



Centrifugació de les mostres

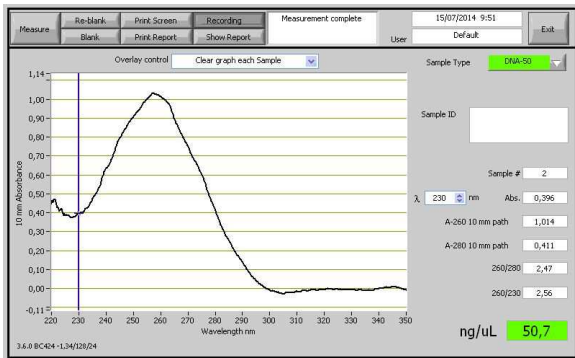


- Posem 1µl de la nostra mostra en l'òptic (que hem netejat prèviament) i obtenim la concentració d'ADN i uns gràfics que ens indiquen, mitjançant unes corbes, la quantitat d'ADN i primers (que se situen en el 260nm) i la quantitat de proteïnes (que es troben abans del 260nm). Convé que la corba sigui molt pronunciada en el 260nm ja que ens indicarà que hi ha una gran quantitat d'ADN i que no hi hagi cap corba abans dels 260nm ja que així no hi haurà gairebé proteïnes.
- Ara veiem que els resultats de les nostres mostres són molt bones ja que les corbes han sortit gairebé perfectes i per tant tenim unes concentracions d'ADN molt interessants:

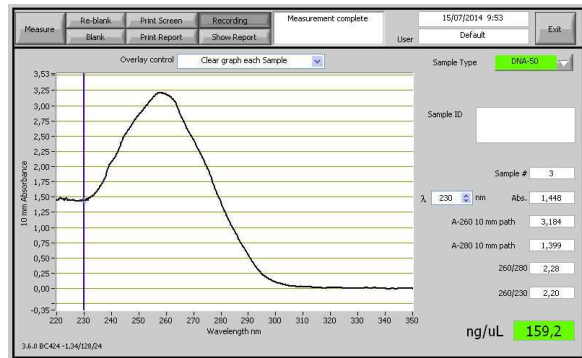
	Mostra 211	Mostra 214
Concentració ADN(ng/µl)	50,7	159,2

Nanodrop: espectrofotòmetre per quantificar el DNA.

Buffer AE: una solució que elueix l'ADN unit a la membrana i serveix com un mitjà de emmagatzematge.



Mostra 211



Mostra 214

Els resultats obtinguts amb la mostra 211 (la que vam preparar a partir d'un sol mosquit) semblen més bons ja que l'interval de concentracions se situa entre 60-250 ng/μl. Així doncs, a partir d'ara continuarem només amb la mostra 211.

## 2. PCR: amplificació del DNA

Durant tot el procés de preparació de la mostra per posar-la a la PCR treballarem sobre gel perquè no volem que les mostres i tampoc els productes no es facin malbé.

- **Material per la PCR:**

- Primers: - 1μl LCO1490F
  - 1μl HCO2198R
  - 1μl LepF1
  - 1μl LepR1
- } FOLMER
- } LEPIDOPTERA

-0,25μl Polimerasa

-1μl ADN(10ng-250ng)

-0,5μl mix de nucleòtids (dNTP, 10mM)

-5 μl buffer(go tag coberless)

-1,5 μl MgCl<sub>2</sub> (25mM)

-14,75 μl ddH<sub>2</sub>O

-tubs de PCR

- Primer preparem la barreja (el *mix*) de primers:

*Mix FOLMER*

*Mix primer LCO*

-10 µl LCO

-30 µl ddH<sub>2</sub>O

*Mix primer HCO*

-10 µl HCO

-30 µl ddH<sub>2</sub>O

*Mix LEPIDOPTERA*

*Mix primer LepF1*

-10 µl LepF1

-30 µl ddH<sub>2</sub>O

*Mix primer LepR1*

-10 µl LepR1

-30 µl ddH<sub>2</sub>O



*Material necessari per la preparació de les mostres per la PCR en gel per tal de que no es facin malbé.*

- **Preparem el *mix* de nucleotids (dNTP):**

-1 $\mu$ L A, 1 $\mu$ L T, 1 $\mu$ L G, 1 $\mu$ L C

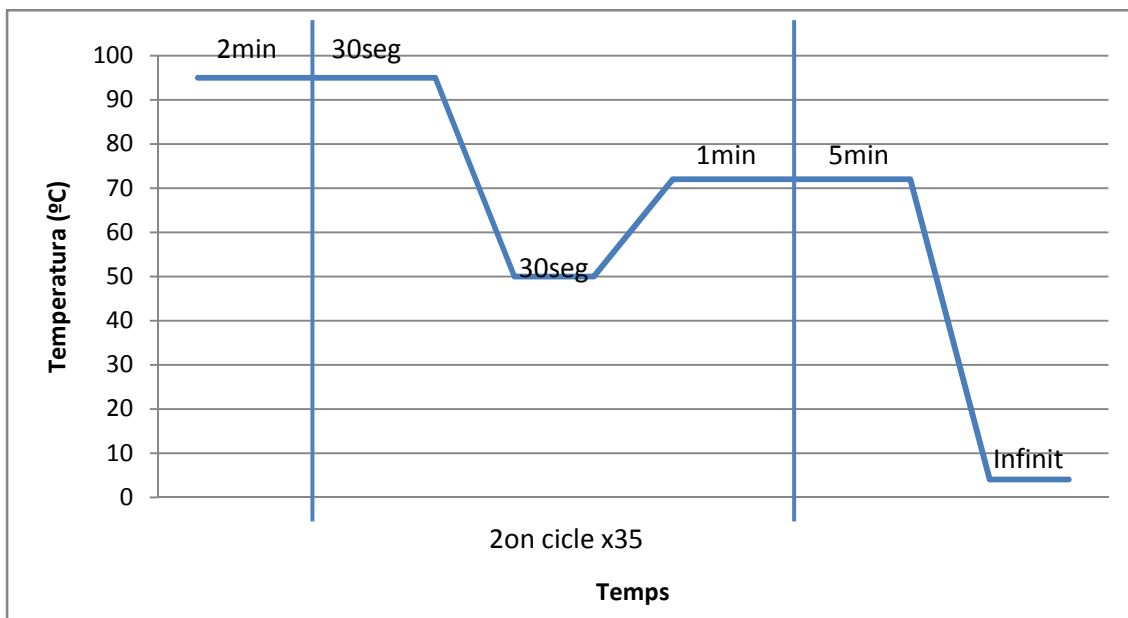
-6 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O

- Un cop tenim els dos *mix* preparats, posem en un tub de PCR les quantitats necessàries que estan descrites en les instruccions del material i fem un *short spin* (barrejem lleument). Cal dir que la mostra 221 l'hem col·locada en dos tubs de PCR diferents i amb dos tipus de primers: Folmer i Lepidoptera per veure amb quin primer obtenim més bons resultats. **Ho posem a la PCR.**



Tubs de PCR en la PCR

- **Programem la PCR de la següent manera:**



Short spin: centrifugació de pocs segons. En el laboratori s'utilitza un vocabulari anglès ja que és el idioma internacional de la ciència i per tant nosaltres utilitzem també aquests tecnicismes perquè és llenguatge propi del laboratori.

Temperatura (°C)	Temps	
95°C	2min	
95°C	30seg	Repetim el cicle 35 vegades
50°C	30seg	
72°C	1min	
72°C	5min	
4°C	Infinit	

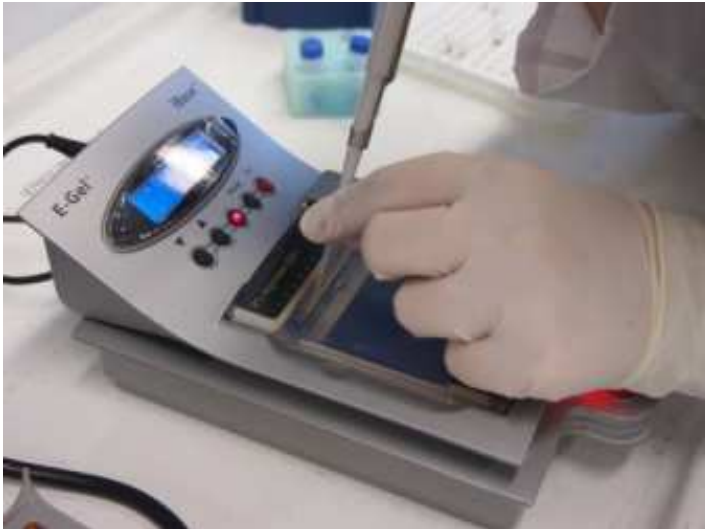
\*Les cinc primeres PCR que hem preparat estaven programades tal com hem detallat, el mateix cicle però canviant el 50°C per 54°C, potser per això no han sortit tantes seqüències com esperàvem.

La PCR comença amb la desnaturalització del DNA. Les mostres s'escalfen fins 95°C per desnaturalitzar l'ADN, és a dir, separar les cadenes senzilles. Seguidament, la temperatura baixa fins 50°C. Això permet als primers L(left) i R(right) reconèixer els parells de bases a les seves seqüències complementàries. Els primers són encebadors que estan dissenyats per amplificar justament la regió d'ADN que ens interessa. A continuació la temperatura s'eleva fins 72°C, cosa que permet que la polimerasa estengui els primers i sintetitzi una cadena d'ADN. Això ho repetim 35 vegades per amplificar el ADN.



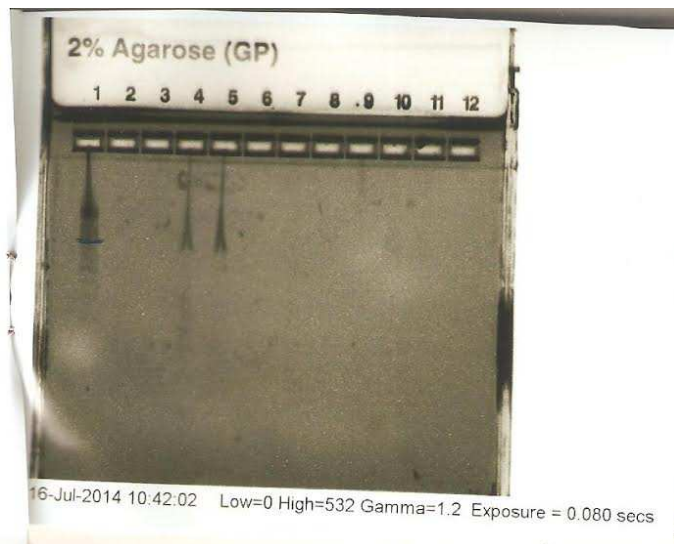
PCR ja programada en marxa

- Fem una electroforesi per comprovar que hem obtingut ADN en la PCR.
  - Posem el gel d'agarosa al 2%, que abans hem hagut de preparar, l'e-gel i carreguem la maquina amb TAE1X (aigua salina).
  - Col·loquem 10µl de *leader* al primer forat del gel perquè ens serveixi per mesurar el pes molecular que tenen les bandes. Nosaltres utilitzarem el de 100bp perquè el gen COI (el gen que nosaltres seqüenciem) que és el gen que codifica l'enzim citocrom oxidasa I) té 600 nucleòtids. I en els forats continus col·loquem 5µl de la nostra mostra (4µl de ADN de la PCR i 1µl de loading buffer).



*Col·locació de la nostra mostra (4µl d'ADN de la PCR i 1µl de loading buffer) en els forats del gel.*

- Connectem el e-gel a 125V durant 35 minuts.
- Un cop ha passat el temps de l'electroforesi traiem el gel i si no s'ha tenyit prou el tenyim amb SaverSafe per poder veure les bandes.
- Portem el gel al geldoc per veure si hi ha ADN a les mostres. Els resultats de les mostres 211 han estat positius com podem veure en la fotografia ja que tenia bandes als 100bp.



*Resultats de l'electroforesi (mostra 211 i 214). Observem que aquestes dues mostres (carrera 4 i 5) tenen la mida esperada, tal com es veu en comparar-ho amb el leader (carril 1).*

Leader: líquid que ens serveix com a guia dels bp.

Loading buffer: líquid blavós que s'utilitza per facilitar la càrrega i el seguiment de les mostres d'ADN durant l'electroforesi en gel.



### 3. Purificació de l'ADN

- Durant tot el procés de purificació posarem la centrifugadora a 13000rpm.
- Afegim 24ml d'etanol(96-100%) al buffer PE perquè funcioni correctament.
- Posem en un eppendorf 21µl de la mostra extreta de la PCR i 105µl de buffer PB.
- Passem el contingut del eppendorf a un QIA spin-column.
- Ho centrifuguem durant 30-60 segons (nosaltres ho farem 45s) i llencem el líquid restant que queda al tub collection però no el tirem si no que el reutilitzem.
- Ara, per netejar, afegim 750µl de buffer PE i ho centrifuguem durant 30-60 segons (45s).
- Un altre cop llencem el contingut del tub collection i ho tornem a col·locar tal com estava per reutilitzar-lo.
- Centrifuguem durant 1 minut i ara sí que canviem el tub collection per un de nou.
- Afegim 30µl de buffer EB al centre de la membrana del QIA spin-column però sense fer-la malbé.



*Pipetejant el buffer PB*

- Deixem reposar les mostres durant 1 minut i després les centrifuguem durant 1 minut.
- Ara fem un control al nanodrop.
  - Repetim els passos del nanodrop però aquest cop posant com a *blank* el buffer EB.
  - Els resultats han estat positius tant en la corba com en la quantitat de DNA.

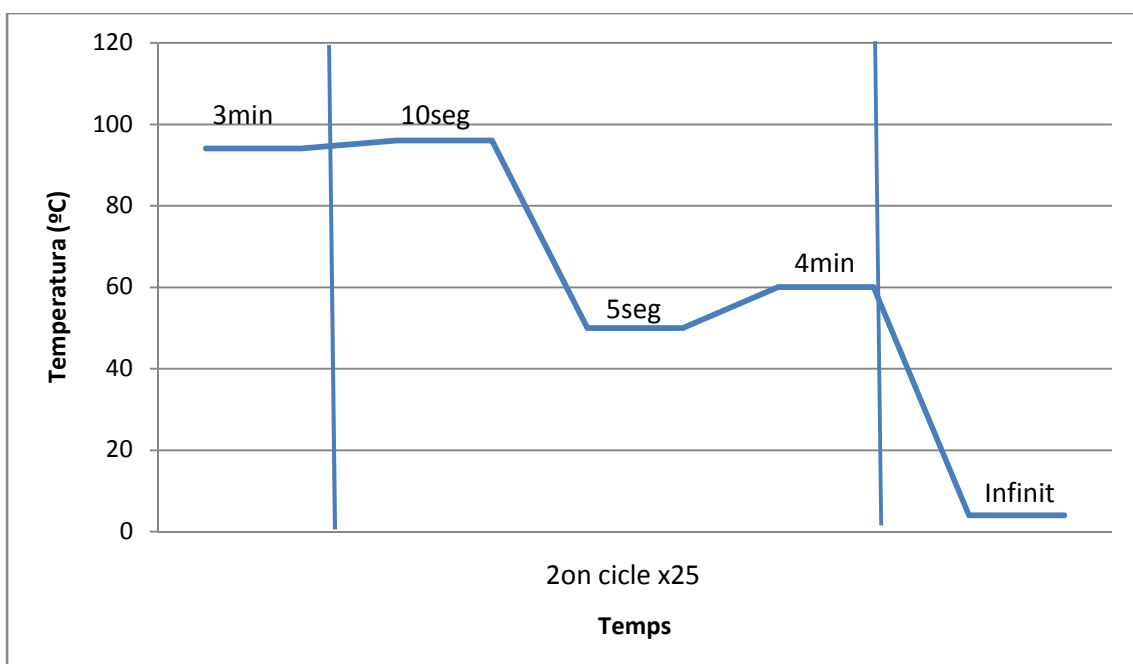
	Mostra 211F (folmer)	Mostra 211I(lepidoptera)
Concentració ADN(ng/µl)	47,4	56,9

#### 4. PCR de seqüenciació

- Preparem la següent solució per la PCR de seqüenciació d'un volum total de 10 $\mu$ l:
  - 2 $\mu$ l Big Dye
  - 1  $\mu$ l de cada primer.
  - 1  $\mu$ l mostra de DNA
  - 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- Programem la PCR de seqüenciació de la següent manera:



*Programació de la PCR. Indiquem els intervals de temps i temperatura i el nombre de repeticions.*



Temperatura (°C)	Temps
94°C	3min
96°C	10seg
50°C	5seg
60°C	4min
4°C	Infinit

Repetim 25 vegades el cicle

## 5. Purificació del ADN

- 5.1. Preparam el *mix* de purificació posant en un eppendorf de 1,5ml:
  - 5µl 500M EDTA
  - 15µl ddH<sub>2</sub>O
  - 20µl 3M NaOAc
  - 500µl etanol 100%
- Posem en un eppendorf 10µl de la mostra de ADN de la PCR i 10µL de ddH<sub>2</sub>O.
- Hi afegim a les mostres 54µl del *mix* preparat.
- Centrifuguem les mostres en un *short spin* i deixem reposar la mostra durant 15 minuts a temperatura ambient.
- Centrifuguem durant 20 minuts a 14000 rpm a -4°C.



Fent un "short spin"

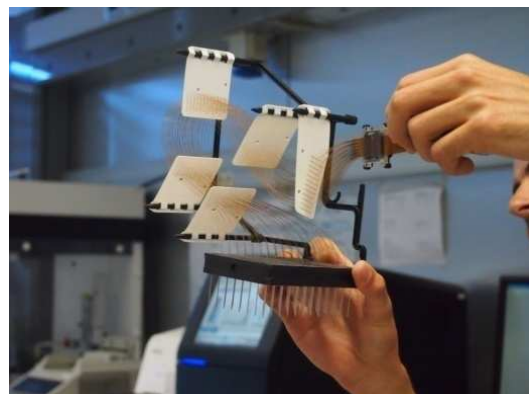
- Eliminem l'etanol de la solució pipetejant l'etanol que ha quedat a sota perquè és més dens.
- Afegim a les mostres 200µl de etanol al 70%
- Centrifuguem les mostres durant 2 minuts a 14000rpm a -4°C.
- Eliminem completament l'etanol de la mostra (si és necessari centrifuguem més d'un cop).
- Ara hauríem de trobar un *pellet* a l'ependorf però no ens n'ha sortit, probablement és gairebé invisible.
- Deixem assecar les mostres durant 20 minuts a temperatura ambient perquè l'etanol s'evapori del tot.
- Guardem les mostres a -20°C.

## 6. Seqüenciació de l'ADN

Aquesta part es duu a terme en el laboratori de seqüenciació per mans d'experts. En aquesta àrea del Parc Científic de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB), el laboratori de seqüenciació, s'hi fan les seqüenciacions d'ADN de tot el parc. Una seqüenciació és un mètode que té com objectiu llegir les bases nitrogenades de l'ADN, la guanina, la timina, la citosina i la adenina, i ordenar-les en un fragment d'ADN. Això es fa amb una tècnica anomenada SANGER o ELECTROFORESI CAPILAR, una tècnica independent desenvolupada a la dècada de 1970 per Fred Sanger, que utilitza dideoxid nucleòtids, bases químicament alterades, i *primers* per tallar l'ADN en fragments que quedaran separats per grandària. Llavors la seqüència d'ADN es podrà llegir. Però per obtenir, a més de la seqüència, la cromatografia necessitem que la nostra mostra contingui didNTP els quals emeten una llum de color diferent per cada nucleòtid. Aquestes carreres d'ADN es produeixen en uns capil·lars molt llargs per tal d'obtenir millor resolució. El procés dura aproximadament unes dues hores i al final n'obtenim les lletres de la seqüència i una cromatografia.



Sanger o electroforesis capilar



Capil·lars molt llargs que es troben a l'interior de la Sanger

Pellet: DNA aglomerat o comprimit al fons cònic de l'ependorf.

El procés que acabem d'explicar l'hem dut a terme amb les mostres 211 i 214 però com que és gairebé impossible que tinguem resultats amb una única extracció, n'hem fet més. A continuació passem a detallar alguna de les variacions del protocol respecte el que hem explicat i les diferents dificultats que ens han sorgit en cadascuna de les últimes extraccions.

### 2a tanda d'EXTRACCIONS D'ADN

Per la 2a extracció hem fet servir de les mostres 10,16,23,24,A1,A4,C1,C4 (les lletres corresponen a les larves com s'indica en l'inventari) i per saber quina quantitat de mostra ens anava millor, si una o més larves, ho hem provat de les dues maneres. Repetim el procés d'extracció d'ADN que hem seguit en la primera extracció i aquest són els resultats del nanodrop:

	Concentració ADN (ng/μl)
Mostra 10	1 ng/μl
Mostra 16	4 ng/μl
Mostra 23	3,3 ng/μl
Mostra 24	5,3 ng/μl
Mostra A1	5,3 ng/μl
Mostra A4	4,4 ng/μl
Mostra C1	3,9 ng/μl
Mostra C4	5,4 ng/μl

Els resultats han estat negatius ja que la concentració d'ADN que hem pogut extreure és insuficient i els gràfics obtinguts al nanodrop gairebé no tenen corba. Així que repetim l'últim pas del protocol però aquest cop afegint 100μl de buffer AE en comptes de 200μl. Però al repetir aquest últim pas els resultats del nanodrop no milloren així que busquem un perquè. Arribem a la conclusió que és possible que hagi sortit malament perquè hem utilitzat un eppendorf en lloc d'un tub collection (ja que s'havien acabat), així que, com que els eppendorfs són més curts, el líquid restant tocava el filtre i per tant la mostra es pot haver fet malbé. A més de què no vam posar tota la mostra en el DNeasy Mini Spin Column perquè es filtrés ja que no hi cabia prou bé. No podem continuar, així que farem una nova extracció.

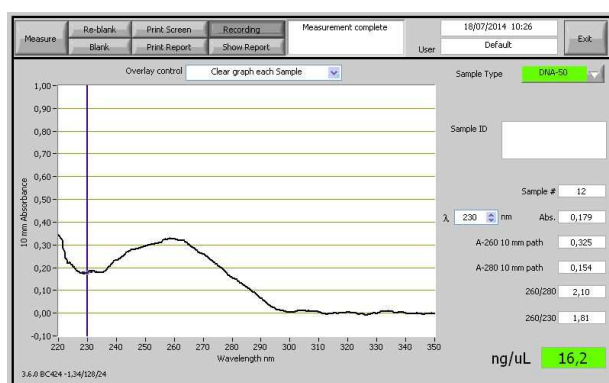
### 3a tanda d'EXTRACCIONS D'ADN

En aquesta 3a extracció hem fet servir les mostres 10, 16, 23,24,A,C. Un altre cop, amb aquestes mostres realitzem tots els passos de l'extracció i els resultats del nanodrop són:

	Concentració ADN (ng/μl)
Mostra 10	26,4 ng/μl
Mostra 16	21,2 ng/μl
Mostra 23	19,9 ng/μl
Mostra 24	28,9 ng/μl

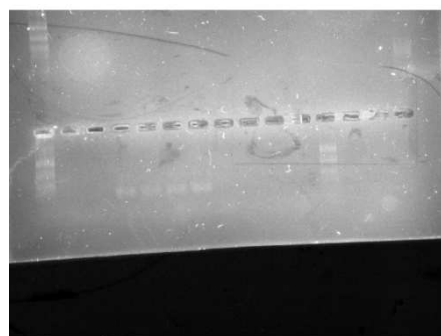
Mostra A	3,6 ng/ $\mu$ l
Mostra C	6,1 ng/ $\mu$ l

Les concentració d'ADN que obtenim no és ben bé la que esperàvem trobar i els gràfics tampoc, ja que hi ha una gran quantitat de proteïnes. Probablement, la raó d'aquest excés de proteïnes rau en el fet que els mosquits, igual que les mosques, tenen una coberta de proteïnes força gruixuda sense quasi cèl·lules. Com que els resultats no han estat del tot satisfactoris repetim l'últim pas de l'extracció exactament com hem fet en la 2a extracció. Tornem al nanodrop i les úniques mostres que han donat resultats positius són la 10 i la C. Repetim tots els passos de la PCR, electroforesis, purificació, nanodrop, PCR de seqüenciació i última purificació però amb una variació: aquest cop únicament utilitzarem els primers Folmer perquè són els que ens han donat més bons resultats en la primera electroforesi ( de la mostra 211).



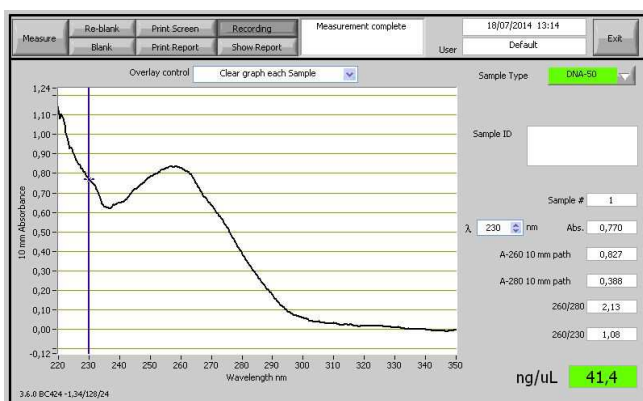
*Resultats del nanodrop de la mostra C. Hi veiem una mica de corba no gaire marcada i la quantitat (ng/ $\mu$ l) no es gaire elevad. Tot i així hi ha quantitat de DNA per tant podem continuar.*

*Resultats de la electroforesis de la mostra C i 10. Veiem que les dues mostres tenen una mida esperada ja que coincideixen amb el leader, tot i que es veuen poc marcades.*



#### 4a tanda d'EXTRACCIONS D'ADN

En la 4a extracció hem fet servir sis mostres més: A, A', B, B', 23, 24. Seguim tots els passos indicats anteriorment i únicament obtenim bons resultats al nanodrop amb les mostres A, A'. Continuem fent el mateix protocol fins l'electroforesi, llavors la mostra A ja ens queda descartada perquè no té prou DNA. Així doncs, continuem amb la mostra A' fins que no podem continuar amb aquesta mostra ja que no ha donat resultats positius en el darrer nanodrop (el de la purificació de seqüenciació).



Resultats del nanodrop de la mostra A

### 5a tanda d'EXTRACCIONS ADN

En la 5a extracció hem fet servir les mostres 23, 24, B, B', AA, AA'. En aquesta extracció utilitzarem un mètode més ràpid. Aquest mètode el fa servir un científic del CRG per l'extracció d'ADN de mosques i per tant, és probable que ens doni també bons resultats amb mosquits. Aquest protocol consta dels passos següents:

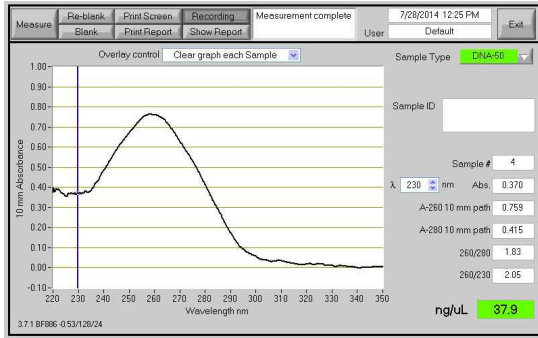
- Posem un mosquit a l'ependorf i hi afegim 50 µl de SB i 0,55µl de proteïna K.
- Fem un *vortex* durant uns segons.
- Posem la mostra 30 min a l'incubadora a 37°C.
- Posem la mostra 3 min a l'incubadora a 95°C.
- Anem al nanodrop per fer el control de la mostra.



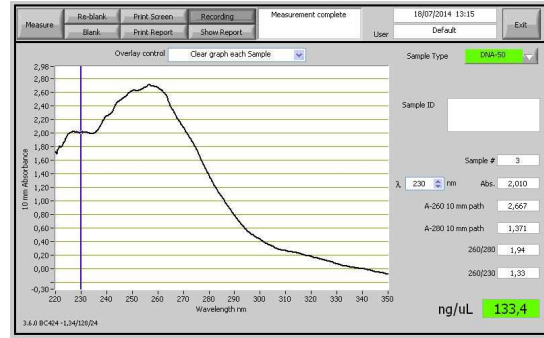
Mostres de la 5ª extracció en el procés de pipetejar la mostra i posar-la al DNeasy Spin Column

Un cop ja tenim feta l'extracció continuem a partir d'ara amb els mateixos passos del primer protocol. Els resultats del nanodrop han sortit positius, tot i que les mostres estaven molt

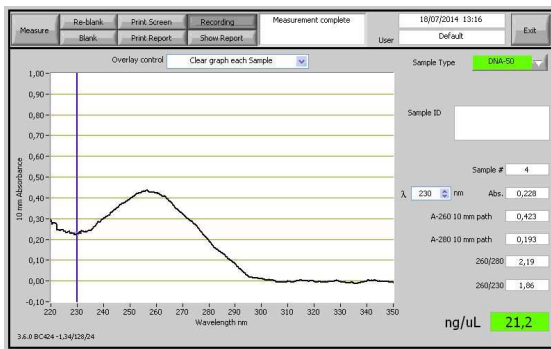
brutes perquè no havien estat filtrades (com es fa en l'altre protocol). Continuem amb la PCR i l'electroforesi amb totes les mostres excepte la mostra 23 ja que no ha donat bon resultat en l'electroforesi. Després purifiquem les mostres, fem la PCR i les deixem a -4°C fins al cap de dues setmanes. Tornem a purificar, comprovem els resultats en el nanodrop i com que ens han sortit positius, fem la PCR de seqüenciació i purifiquem les mostres per enviar-les a seqüenciar.



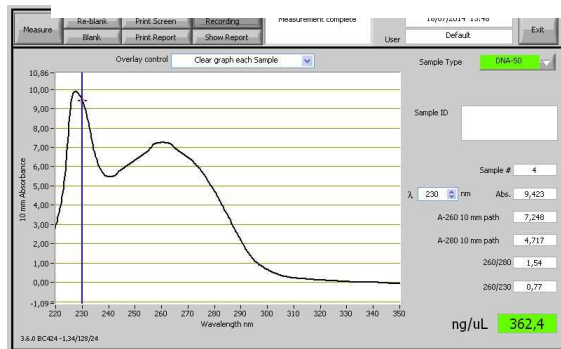
Resultats del nanodrop de la mostra 24. Veiem una corba esperada i una quantitat dintre de l'interval adequat.



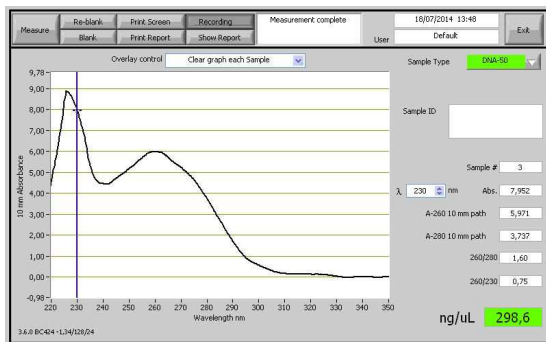
Resultats del nanodrop de la mostra B. Veiem una corba esperada tot i que amb una mica de brutícia i una quantitat d'ADN una mica elevada.



Resultats del nanodrop de la mostra B'. Tot i que la corba no es gaire marcada ens indica juntament amb la quantitat correcte d'ADN que podem continuar.



Resultats del nanodrop de la mostra AA. La corba Ens mostra que hi ha massa brutícia i la quantitat de DNA es massa elevada.



Resultats del nanodrop de la mostra AA'. La corba Ens mostra que hi ha massa brutícia i la quantitat de DNA es massa elevada.



Resultats de l'electroforesi (mostra 23, 24, A, A', BB', AA, AA'). Observem que totes les mostres aproximadament tenen la mida esperada ja que s'assemblen a l'indicador de leader.

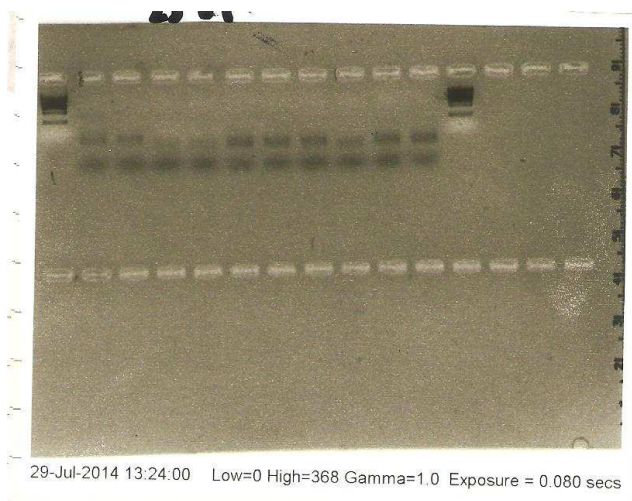


### 6a tanda d'EXTRACCIONS D'ADN

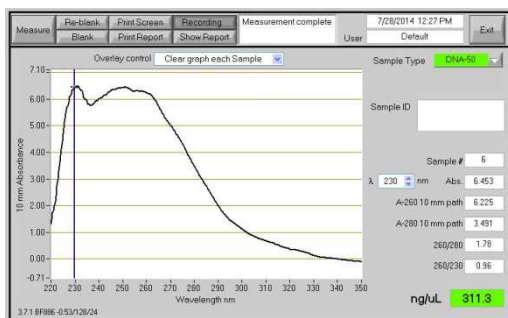
Per aquesta extracció fem servir les mostres AR, 24R, 23R. Repetim els mateixos passos del protocol original fins deixar les mostres a la incubadora. Traiem les mostres de la incubadora i comencem amb el protocol. Però un cop li afegim el buffer AL observem que les mostres es tornen blanques i canvien la seva consistència ja que hem posat les mostres calentes de la incubadora en un portaobjectes congelat de manera que les mostres s'han fet malbé. Intentem arreglar-ho tornant a posar la mostra a la incubadora i seguint amb els passos però la mostra s'ha perdut ja que no es filtra pel DNeasy Spin Column ni desapareix aquesta textura així que llencem les mostres a la brossa biològica ja que han estat fetes malbé pel canvi brusca de temperatura.

### 7a tanda d'EXTRACCIONS D'ADN

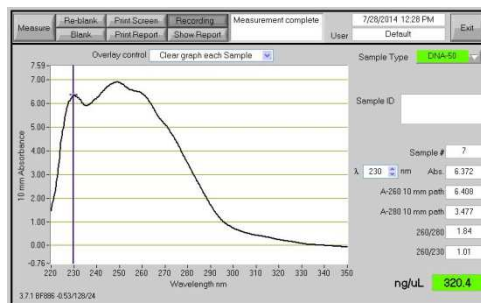
Per aquesta extracció fem servir de les mostres 23'R i 24'R. Seguim els passos del protocol ràpid que hem utilitzat en la 5a extracció. Extraïem el ADN, comprovem en el nanodrop, fem la PCR, i tornem a comprovar la quantitat d'ADN en l'electroforesi però al comprovar-les veiem que no tenen quasi ADN així que repetirem la PCR però variant la quantitat d'ADN ja que en posem el doble i la quantitat de *primers* la reduïm a la meitat per veure si així ens surt més quantitat d'ADN i menys de *primers* en l'electroforesi. Tot i canviar les proporcions, els resultats de l'electroforesi no són bons. Així doncs com que no han donat resultats correctes no continuem amb aquestes mostres.



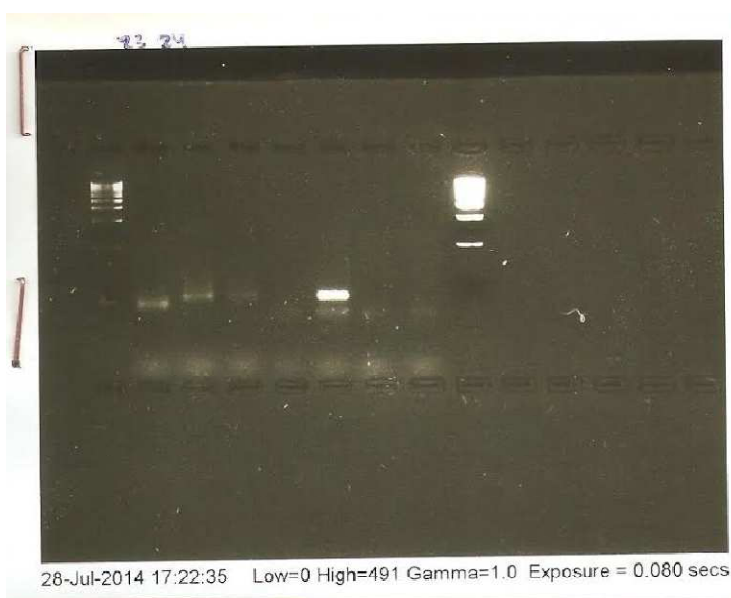
*Resultats de l'electroforesi (mostra 23' i 24'). Veiem que tenim una bona quantitat de DNA ja que coincideix amb el leader.*



Mostra 23'R. Trobem una corba massa marcada i molt bruta. A més de massa quantitat d'ADN.



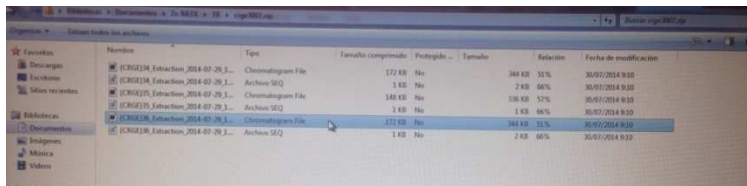
Mostra 24'R Trobem una corba massa marcada i poc neta. A més de massa quantitat d'ADN.



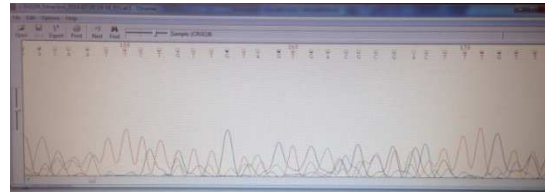
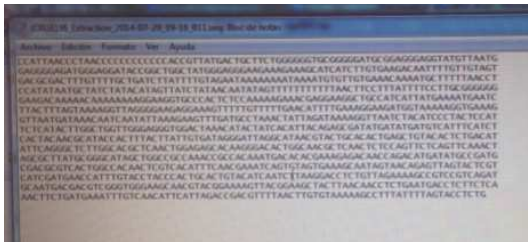
Resultats de l'electroforesi (mostra 23R' i 24R'). Veiem que la quantitat de DNA correspon amb el leader així que està correcta.

## 7. Bioinformàtica

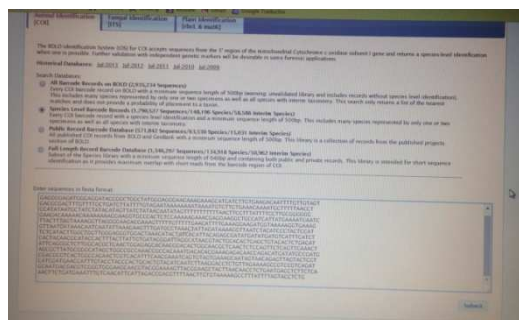
- Un cop tenim les seqüències de les mostres i les cromatografies corresponents, descarreguem els arxius que contenen ambdues coses i el programa informàtic Chromas lite per poder obrir-los conjuntament.
- Obrim la pagina web del Bold System i anem a l'apartat *Identification* i marquem l'opció gen COI. Llavors al espai en blanc hi enganxem la nostra seqüència.
- Si ens surt la correspondència directa amb una espècie, ja ho tenim, però com que el més probable és que no ens surti, anem a un enllaç que ens apareix a la pàgina Blast i hi afegim a més a més la cromatografia. Allà mirem a quina espècie correspon la nostra seqüència mitjançant uns gràfics de barres que ens indiquen a quina espècie s'assembla més la nostra.



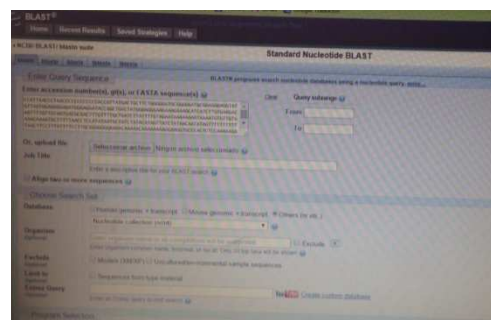
Documents de les seqüències



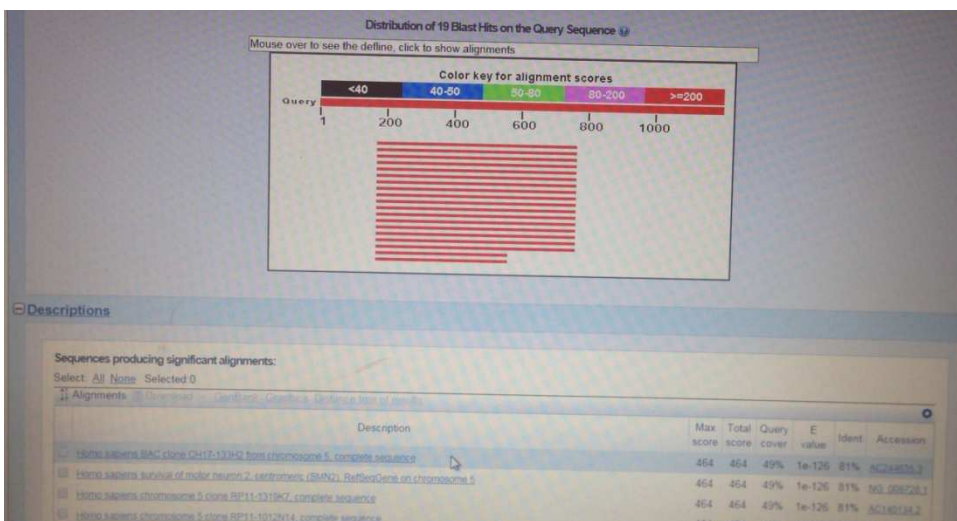
Seqüència i cromatografia de la mostra BF



Blast System



Blast



Resultats de la seqüència de la mostra BF

#### 4.2.3.5. Resultats

De les 33 mostres que hem preparat per treure el DNA i seqüenciar-lo només ho hem aconseguit en les mostres 211F1, 211F2, 211I1, 211I2, 10F, 10R, CF, CR, B'F, B'R, AA'F, AA'R,BF, BR, 24F, 24R, AAF, AAR , és a dir, un en 50% de les mostres. I d'aquestes només hem pogut arribar a identificar l'espècie, mitjançant el tractament bioinformàtic, de les mostres B'R, AA'F, AA'R,BF,BR, AAF. Això vol dir que només hem aconseguit identificar un 20% de les mostres amb aquest mètode. Aquest resultat no és dolent, sovint s'han de fer moltes analítiques abans d'obtenir el resultat definitiu.

També cal dir que totes les mostres que hem arribat a seqüenciar, ha estat utilitzant el mètode d'extracció d'ADN ràpid (descriu a la pàg. 63). Així doncs, si continuem, més endavant, aquesta investigació serà recomanable fer servir aquest sistema d'extracció.

A continuació, trobem les seqüències d'algunes de les mostres. Aquestes mostres són la BR, una larva de mosquit que no va donar cap resultat en els processos bioinformàtiques a causa de manca de lletres indicant les bases nitrogenades. Seguidament trobem les seqüències que van resultar correspondre a *Culex pipiens* i *Culex torrentium*. I, per últim trobem la seqüència d'una de les mostres que va resultar que corresponia al gen 5 del *Homo sapiens*.

```

CCCAGGGATTTTAATCATTGTTGAGTAACTCCTACCGATTTTTGGGGCCAAAGGAGGAATTAACCATG
AAAAATGGG

GGCGCTCACCCCATGAGGGATTACGAATCCCCACTACTGATCCTAATAAGAATTCAGGGGGCCATGGAT
GAGCACAAAA

AAGAAACAATTAACACAAGAGCAGGTGGAGGACGCAGGTGCCTTAAAGAATTTATGACAAACGGAAAA
AAAAGTCTTA

TCCCAAATTGTGGAAAAAAGAGGGGAGG

```

*Resultats de la seqüència BR*

Una seqüència que no era prou llarga per arribar a cap resultat definitiu.

```
CCAGTATTTTTGGGAAACCCAAATCTTCTCATAGCTGTTTCCTGGGGGCCCTGAAACTGATTGAAGCAG
AATTAAGGG

GCGGAGTGTATTTATTGGAAATGAAAAATTTATAATGTAAGGAAGGAAGCTCATGCTTTTATTATAATTTT
TTTTATAGT

AATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATCCTCTTCCTTTAATGTTAGGAGCTCCAGATATAGCC
TTTCCTCGA

ATAAATAATATAAGTTTTTGAATACTACCTCCCTCATTGACACTACTACTTTCAAGTAGTTTAGTAGAAAAT
GGAGCTGG

AACTGGATGAACAGTGTATCCCCCTTTTCATCTGGAACAGCTCATGCTGGAGCTTCAGTAGACTTAGCTA
TTTTTCTT

TACATTTAGCAGGAATTTTCATCAATTTATTTTTTTTTTAAATTTTTTTAATTAGTAATTAATATACGATCTTC
AGGAAT

TACTCTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCTGTAGTAATTACTGCAGTTTTACTACTTCTTTCTTTACCTG
TTTTAG

CAGGAGCTATTACTATACTATTAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTTTTTTGATCCAATTGGAGGAGGA
GATCCAATT

TTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGACATCCAGAAGTTTAGTCATAGCTGTTTCCTAAACC
```

Resultats de la seqüència AA'F → *Culex torrentium*

Un cop hem obtingut aquesta seqüència (que ara és prou llarga) el programa informàtic Bold System ens dona una semblança d'un 95% al *Culex torrentium*. Podem assegurar doncs que es tracta d'aquesta espècie.

```
CCTTTAAATTTGATGCATATAAGAGGTGGAGTGGTACCTGAGGTCCGGGAGGGACCCTGAGAGCAGACTCTAG
AGAAAGA

AAAGAAGAAATGGTTCTTGGAATGACAACAAAGGAAAAGGGGAGAAAAGAAAATTAGGGAAAGCCTTCTACCA
ATACCCTG

ATTATTGGAGGAATCGGAAAATGCTTCATCTCACGAGAATGCAGGAGCACCGGTATGGCCTTTCCTCGAAGAA
ATAACAA

AAGTTCTGGACTACCACCTCCTTCGGTGACACATGTACTTCCAAGAAAATAAGAAGACAATGGAGACGGGACA
GGATGAA

CAGGGTATCCCCCTCATAGAACTGGAACAGCTCATGCCGGAGCTTCAGGGGACTTAAACTTTTATTTCTTTACAT
TTAGC

AGGAATTTTCATCAATTTTCGGTATTTTTTTTAAATTTAATTATTTAATTAACAAACACCGACCTTCAGGAACACTCTT
GACC

GAATACCTTAATTTGTTGGACCAGAATAC
```

Resultats de la seqüència AAF → *Culex pipiens*

Si processem aquesta seqüència que hem obtingut de la PCR de seqüenciació amb programes informàtics com el bold system trobem que la seqüència correspon a un *Culex pipiens*.

```
CCATTAACCCTAACCCCCCCCCACCGTTATGACTGCTTCTGGGGGGTGCGGGGGATGCGGAGGGAGGTAT
GTTAATG

GAGGGGAGATGGGAGGATACCGGCTGGCTATGGGAGGGAAGAAAGAAAGCATCATCTTGTGAAGACAATTT
TGTTGTAGT

GACGCGACTTTGTTTTGCTGATCTTATTTTGTAGAATAAAAAAATAAAAATGTGTTGTGAAACAAAATGCTTTTT
AACCT

CCATATAATGCTATCTATACATAGTTATCTATAACAATATAGTTTTTTTTTTAACTCCTTTATTTTCCTTGCGGG
GGG

GAAGACAAAAACAAAAAAGGAAGGTGCCACTCTCCAAAAGAAACGAGGAAGGCTGCCATCATTATGAA
AATGAATC

TFACTTTAGTAAAAGGTTAGGGGAAGAGGAAAGTTTTTGTGTTTGAACATTTTGAAGGAAGATGGTAAAAAG
GTGAAAG

GTTAATGATAACAATCAATATTAAGAAGTTTGATGCCTAACTATTAGATAAAAGGTTAATCTACATCCCTAC
TCCAT

TTCATACTTGGCTGGTTGGGAGGGTGGACTAAACATACTATCACATTACAGAGCGATATGATATGATGTCATT
TCATCT

CACTACAACGCATACCACTTTACTTATTGTGATAGGGATTAGGCATAACGTA CTGCACACTGAGCTGTACACTCT
GACAT

ATTCAGGGCTCTTGGCACGCTCAACTGGAGAGCACAAGGGACACTGGCAACGCTCAACTCTCCAGTTCTCAGTT
CAAACCT

AGCGCTTATGCGGGCATAGCTGGCCGCCAAACCGCCACAAATGACACACGAAAGAGACAACCAGACATGATA
TGCCGATG

CGACGCGTCACTGGCCACAACCTCGTCACATTTCAACGAAATCAGTGTAGTGAAAGCAATAGTAACAG
AGTTAGTACTCGT

CATCGATGAACCATTTGTACCTACCCACTGCACTGTACATCAATCTTAAGGACCTCTGTTAGAAAAGC
CGTCCGTCAGAT

GCAATGACGACGTCGGGTGGGAAGCAACGTACGGAAAAGTTACGGAAGCTACTTAACAACCTCTGA
ATGACCTCTTCTCA

AACTTCTGATGAAATTTGTCAACATTCATTAGACCGACGTTTTAACTTGTGTA AAAAGCCTTTATTTTA
GTACCTCTG
```

Resultats de la seqüència BF → Homo sapiens

El resultat obtingut en el bold system d'aquesta seqüència ens dona una semblança d'un 49% al cromosoma 5 de *Homo sapiens*.

Quadre resum dels resultats

B'R →	cromosoma 5 del Homo sapiens →	Mostra de Campelles, abeurador 2
AA'F	<i>Culex torrentium</i> →	Mostra de Campelles, abeurador 1
AA'R	<i>Culex torrentium</i> →	Mostra de Campelles, abeurador 1
BF →	cromosoma 5 del Homo Sapiens →	Mostra de Campelles, abeurador 2
BR →	cromosoma 5 del Homo Sapiens →	Mostra de Campelles, abeurador 2
AAF →	<i>Culex pipiens</i> o <i>Culex</i> →	Mostra de Campelles, abeurador 1

Els resultats que hem obtingut són molt interessants i alhora sorprenents.

1. D'una banda hem corroborat la hipòtesi que teníem : a terra baixa només trobem *Culex pipiens* i a alta muntanya, a causa de l'augment d'altitud *Culex torrentium* que comparteix nínxol ecològic amb el *Culex pipiens*. En estudis fets a la Cerdanya i a Europa central els resultats són molt semblants als nostres.
2. D'altra banda, hem quedat sorpresos per la presència d'unes seqüències que eren en un 49% semblants a les de clons del cromosoma 5 de *Homo sapiens* fets artificialment als laboratoris.

Aquests darrer resultat ens suggereix moltes **preguntes**, la més immediata que ens femem és la següent:

**Perquè ha sortit una seqüència d'un *Homo sapiens* i no la d'un mosquit? A què ho podem atribuir?**

Per respondre-la hem de contestar abans un seguit de preguntes més per després formular-nos unes hipòtesis. Aquestes preguntes són:

- El resultat és una **contaminació**?

Hem obtingut aquest mateix resultat en dues mostres, que corresponen totes a mostres de dues larves (una d'elles amb el forward i el revers). Però tot i que ho trobem en dues



mostres independents, el fet podria ser degut a una contaminació durant la manipulació al laboratori perquè ha succeït en la mateixa tanda d'extraccions, de manera que hem fet els mateixos passos en totes dues.

Tot i que això, creiem que és poc probable ja que en aquesta tanda d'extraccions hi havia sis seqüències (no només dues) entre les qual hi ha hagut una mostra de *Culex torrentium* (amb el forward i el revers), una mostra de *Culex pipiens* i dues mostres de *Homo sapiens* (una amb revers i forward).

A banda del que acabem d'explicar, les tres mostres de larves provenien de la mateixa bassa, així és que podria haver-hi hagut una possible contaminació en el lloc d'origen.

Cal afegir també que hi podria haver hagut una contaminació en el moment de fer les seqüències, ja que aquestes tres seqüències es van fer en un mateix dia i separades de la resta.

- És el que havia **menjat** el mosquit?

Difícilment ja que les mostres eren larves i no mosquits adults així que és impossible que en l'estómac de les larves hi hagués sang humana. Si la mostra hagués estat un mosquit adult hi hauria hagut una alta probabilitat de que s'hagués seqüenciat sang humana xuclada pel mosquit, però no ha estat el cas.

- Com pot ser que s'hagi seqüenciat una cosa **diferent al Cytochrome c oxidase I (COI)**?

En els humans també hi trobem el COI però es diferent del dels mosquits. Comparant les seqüències d'aquestes mostres que coincideixen en un 49% amb el cromosoma 5 humà amb la seqüència del *Culex pipiens* que hem obtingut de les altres mostres comprovem que no s'assemblen gens així que estem segurs que el que s'ha seqüenciat no és el COI. Així doncs el que ha pogut passar és que els *primers* es poden haver col·locat erròniament a una part del cromosoma del mosquit que no fos el COI donant lloc a una seqüència de una part totalment diferent del COI.

- La seqüència dels **primers** es troba en el cromosoma 5 de l'*Homo Sapiens*? Algú ha utilitzat abans aquests *primers*?

La seqüència del *primer* no es troba en el cromosoma 5 del *Homo sapiens* per tant no es pot haver seqüenciat el *primer*. Aquest *primers* es van inventar a 1994 amb el propòsit de seqüenciar el COI i només s'han utilitzat per això.

- Aquest **cromosoma 5** humà ha estat estudiat? Per quin motiu? Quins *primers* han utilitzat per estudiar-lo?

El cromosoma 5 té al voltant de 181 milions de parells de bases i representa al voltant del 6% del total de l'ADN de la cèl·lula. Els *primers* que s'utilitzen per seqüenciar els cromosomes humans són específics per això, igual que per seqüenciar insectes utilitzem els folmers o lepidòptera.

- Quina és la diferència entre la seqüència del cromosoma 5 de *Homo sapiens* i la del COI del mosquit? És un % molt elevat? **Estadísticament**, és vàlid?

El que s'ha seqüenciat del mosquit coincideix un 49% amb clons del cromosoma 5 de *Homo sapiens*. És un tant per cent no gaire elevat ja que vol dir que aproximadament la meitat de la seqüència coincideix però l'altra meitat no s'assembla gens. Però tot i això és l'únic al que s'assembla una mica.

Un cop ens hem formulat i valorat totes aquestes preguntes se'ns acut de proposar **diferents hipòtesis**.

Hipòtesi 1:

Hi ha hagut una contaminació de la bassa d'on provenien les larves o bé una contaminació en algunes de les mostres per error de manipulació.

Hipòtesi 2:

No hi ha hagut cap contaminació ni en el laboratori ni a la bassa però en el laboratori de seqüenciació les mostres han estat intercanviades per les d'una altra investigació, ja que, justament les tres que donen aquests resultats, van ser seqüenciades un dia diferent a la de la resta de mostres i es va fer a part de la resta. A més aquesta part del procés no el vam fer directament nosaltres i no tenim la certesa absoluta de que es va fer bé.

Hipòtesi 3:

El *primer* s'ha enganxat a una altra part de l'ADN del mosquit i en comptes de seqüenciar el gen COI per el qual és específic aquell *primer*, ha seqüenciat una altra part que casualment coincideix en un 49% amb el cromosoma 5 de *Homo sapiens*. Si aquesta hipòtesi fos la correcta hauríem de procedir a revisar els *primers* que vam utilitzar ja que són del 1994 i potser no són tan específics com es pensava.

Cal afegir que per comprovar i esbrinar quina de les tres hipòtesis que formulem és la correcta i per tal de fer una investigació sense cap mena d'error, hauríem de repetir tot el procediment amb més mostres per corroborar que no ha estat ni una contaminació, ni un canvi de les mostres i poder seguir investigant amb 100% de seguretat la possible relació *Homo sapiens*-mosquit.

#### 4.3.3.6. Conclusions

1. Ens hem adonat que amb la tècnica molecular (seqüenciació de DNA) hem pogut distingir entre espècies morfològicament quasi idèntiques. Hem pogut distingir entre *Culex pipiens* i *Culex torrentium* que morfològicament hauríem estat incapaços de diferenciar.

2. També, hem pogut comprovar la necessitat d'utilitzar aquestes tècniques per identificar espècies molt semblants, però, d'altra banda, també ens hem adonat que es mostra innecessària quan la classificació morfològica és suficient i no ens deixa cap ombra de dubte.

3. Hem comprovat que la nostra hipòtesis sobre la distribució altitudinal i latitudinal de dues espècies vicariants es confirmava. Efectivament, hem confirmat que l'augment d'altitud, igual que de latitud, modifica les proporcions entre *Culex torrentium* i *Culex pipiens*. Així és que, a més altitud (o latitud) augmenta la proporció de *Culex torrentium* en comparació a *Culex pipiens*.

4. Però a més d'això, hem extret altres conclusions. L'ADN conté una gran quantitat d'inhibidors per la PCR els quals poden impedir una activitat correcta de la polimerasa o dels encebadors. A més, algunes parts dels mosquits no permeten extreure un ADN de bona qualitat, especialment les ales i les potes. Per tant és millor treballar només amb l'abdomen ja que un mosquit sencer amb extremitats plenes de inhibidors per la PCR i un exoesquelet amb un munt de quitina proporcionen uns resultats més dolents. (Erik Helmersson et al., 2013)

5. Finalment, una conclusió addicional, la feina de laboratori és llarga i costosa. Demana moltes repeticions i, fins i tot, a vegades, és difícil arribar a obtenir resultats. Nosaltres després de preparar 33 mostres només n'hem aconseguit seqüenciar sis, vam tenir èxit en un 20% de les mostres analitzades. Cal afegir, però, que aquesta tècnica, tot i ser costosa i laboriosa, és necessària per la identificació d'espècies molt properes que no es poden identificar morfològicament. A més de ser un sistema eficaç i eficient en el temps, ja que disposem d'ordinadors de gran capacitat que emmagatzemen milions de dades per tal de classificar espècies i treballar aspectes diferents a nivell mundial.

## 5. CONCLUSIONS GENERALS

Amb aquest treball de recerca hem pogut extreure conclusions que fan referència, d'una banda, a les espècies estudiades, i de l'altra, a les tècniques d'identificació utilitzades, anàlisi morfològica en relació a l'anàlisi molecular.

1. El mosquit més freqüent i més àmpliament repartit per tot el territori és *Culex pipiens*. Aquesta espècie però, tot i ser tan abundant, a alta muntanya és substituïda, en part, per *Culex torrentium*, una espècie molt propera i molt semblant morfològicament. Així doncs, a alta muntanya ens apareix una espècie, *Culex torrentium*, que no trobem a terra baixa. La resta d'espècies, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Anopheles antroparvus*, *Culex impudicus*, *Culiseta longiareolata*, *Ochlerotatus caspius*, les trobem principalment a la terra baixa, sobretot en zones urbanes, excepte *Ochlerotatus caspius* que també el trobem força abundantment als horts. *Culiseta longiareolata*, igual que *Culex pipiens*, la trobem tant en terra baixa com a muntanya mitjana i alta. En canvi, *Culex torrentium* i *Culex impudicus* els trobem només a alta muntanya.

Comparant amb altres estudis hem comprovat que *Culex pipiens* és l'espècie més abundant en relació a les altres espècies que si bé a la nostra àrea d'estudi, en general a la península Ibèrica no ho és. També hem pogut observar que *Ochlerotatus caspius* es més abundant a mesura que disminueim de latitud. A més, *Culiseta longiarolata* i *Aedes albopictus* es mostren menys abundants, com en el nostre estudi.

2. Hem pogut comprovar que, la identificació morfològica és un sistema d'identificació ràpid i eficaç excepte quan ens trobem amb espècies que són molt semblants morfològicament, tant que són molts difícils de distingir encara que s'utilitzi la lupa binocular. En aquests casos hem hagut de recórrer a la tècniques moleculars (seqüenciació de DNA) per identificar-les correctament. Així doncs, les tècniques moleculars, són molt útils i imprescindibles per identificar espècies molt properes, però es mostren innecessàries quan la classificació morfològica d'espècies es pot fer fàcilment. En el nostre cas hem pogut identificar totes les espècies morfològicament excepte *Culex pipiens* i *Culex torrenium* pels quals hem de reconèixer a la seqüenciació del seu DNA ja que són espècies molt semblants.

A més, també cal dir que l'ADN conté una gran quantitat d'inhibidors per la PCR els quals poden impedir una correcta activitat de la polimersa o dels encebadors. També és important tenir en compte que hi ha parts del mosquit com les potes i les ales que no permeten una bona extracció d'ADN.

Es important tenir en compte que la feina de laboratori és llarga i costosa i que demana moltes repeticions però a vegades és necessària per la identificació d'espècies molt properes que no es poden identificar morfològicament.

3. Es produeix un fenomen de distribució latitudinal i altitudinal de dues espècies vicariants: *Culex pipiens* i *Culex torrentium*. Amb l'augment d'altitud, igual que amb la latitud, es modifiquen les proporcions de *Culex pipiens* en front de *Culex torrentium* ja que a més altitud o bé més latitud, augmenta la proporció de *Culex torrentium* i en disminueix proporcionalment la de *Culex pipiens*. Aquest fenomen l'hem observat a alta muntanya i es repeteix de manera idèntica a Europa central. Per tant, aquestes espècies de mosquits segueixen una distribució latitudinal que s'avé perfectament amb la distribució altitudinal.

## 6. AGRAÏMENTS

Ara es l'hora de donar les gràcies a totes aquelles persones que han fet possible la realització d'aquest Treball de Recerca. Començant per la meva tutora del treball, la Laia Casanovas, la qual m'ha guiant molt i m'ha ajudat durant tot el procés, i, sobretot m'ha l'oportunitat de participar en el Barcode Project Catalunya guiat per professors universitaris que participen al programa Professors i Ciència, projecte sense el qual no hagués estat possible dur a terme aquest treball. A més voldria agrair la implicació i les ganes de l'Annick Labeeuw, la supervisora del laboratori del CRG, que sempre ha estat disposada a ajudar i guiar el en el meu treball, i el dels meus companys de laboratori, a qui també dono les gràcies per l'ajuda durant totes les hores de treball al laboratori. I, es clar, que he d'agrair al Barcoding Project per promoure la ciència i la investigació en el jovent i donar-me la possibilitat de participar en aquesta gran experiència que s'emmarca en el camp científic de la investigació. També vull agrair a Paul Hebert i, sobretot, a Yvonne Linton del projecte de Mosquito Barcoding Initiative pel temps que m'han dedicat i la seves opinions que m'han ajudat a millorar el treball. És indispensable, però, donar les gràcies al Centre de Control de Mosquits, principalment a Carles Aranda i a Roger Eritja per aportar-me nous coneixements sobre aquest tema i per facilitar-me el préstec de materials. També, voldria agrair a Joan Barceló de permetre'm l'accés al seu hort i a totes aquelles persones que han col·laborat amb mi en la recollida de les mostres de mosquits com l'Ivan Matillas.

Per últim, voldria donar les gràcies a Laura Rubio, Jesús Ordoño i Pau Sotelo pels seus consells i per donar-me el seu punt de vista durant tot el treball, sempre amb ganes i entusiasme perquè sortís el millor possible. Cal agrair també als meus pares i amics el suport que m'han donat durant el procés d'elaborar el treball. Sense totes i cadascuna d'aquestes persones no hagués estat possible la realització d'aquest Treball de Recerca. Gràcies.

## 7. BIBLIOGRAFIA

### LLIBRES

- ARANDA PALLERO, CARLES. *Detecció d'arbovirus en vectors a Espanya*. Departament de sanitat i Anatomia Animals. Facultat de Veterinaria. Bellaterra, 2010
- ANGEL, G. BRUNHES, J. HERVY, J.-P. GEOFFROY, B. RHAÏEM, A. SCHAFFNER, E. *Les moustiques d'Europe* [CD-ROM]. Paris. IRD (Institut de recherche pour le développement), 2000.
- DANABALAN, Renita, J. PONSONBY, David i LINTON, Yvonne-Marie. *A Critical Assessment of Available Molecular Identification Tools for Determining the Status of Culex pipiens S.L. in the United Kingdom*. Journal of the American Mosquito Control Association, 28(4s):68-74: The American Mosquito Control Association, 2012.
- ERITJA, R., ARANDA, C., PADRÓS, J., GOULA, M., LUCIENTES, J., ESCOSA, R., MARQUES, E., & CACERES, F. *European Mosquito Bulletin*. Espanya, 2000.
- ERITJA, R. BUSQUET, INMACULADA. ARANDA, CARLES. *Servei metropolità de control de mosquits*. Corporació metropolitana de Barcelona. Barcelona, 1886.
- HELMERSON, ERIK. *Molecular identification of mosquito species*. UPPSALA UNIVERSITET, 2013.
- LINTON, Yvonne-Marie. *Barcoding Turkish Culex mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden biodiversity and new potential vectors*. Walter Reed Biosystematics Unit, Smithsonian Institution Museum Support Center, MRC-534. Sense data de publicació.
- PIFERRER, FRANCESC. *La biologia d'ahir i d'avui*. Societat catalana de biologia. Barcelona, 2012.

### PÀGINES WEB (les ressenyem per ordre de consulta)

- Pàgines web de conceptes científics [en línia],
  - o Molècula de ADN [en línia],
    - <<http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/dna/builddna/>>
    - <<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/extraction/>>
  - o Electroforesis [en línia], <<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>>
  - o PCR [en línia],
    - <<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/pcr.html>>
    - <[http://www.hhmi.org/biointeractive/dna/DNAi\\_PCR.html](http://www.hhmi.org/biointeractive/dna/DNAi_PCR.html)>

- Seqüenciador Sanger [en línia],
  - <<http://www.dnalc.org/resources/animations/sangerseq.html>>
  - <<http://www.dnalc.org/view/15923-Cycle-sequencing.html>>
- Bioinformàtica [en línia], <<http://dnasubway.iplantcollaborative.org/>>
- Una mica de tot [en línia],
  - <<http://learn.genetics.utah.edu/units/basics/tour/>>
  - <<http://www.dnafb.org/dnafb/>>
  - <<http://www.dnalc.org/websites/>>
  - <<http://learn.genetics.utah.edu/>>

Consultat el dia 17/09/2014

- Webs del protocol [en línia],
  - <<http://www.dnabarcodingassistant.org/>>
  - <<http://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=EN&ver=1>>
  - <[http://ccdb.ca/docs/CCDB\\_Amplification.pdf](http://ccdb.ca/docs/CCDB_Amplification.pdf)>
  - <[www.ccdb.ca/docs/CCDB\\_PrimerSets.pdf](http://www.ccdb.ca/docs/CCDB_PrimerSets.pdf)>
  - <<http://www.promega.es/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/gotaq%20g2%20flexi%20dna%20polymerase%20protocol.pdf>>
  - <<http://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=3987caa6-ef28-4abd-927e-d5759d986658&lang=EN&ver=1>>
  - <[http://www.upf.edu/sct/\\_pdf/genomica/en/Sequencing\\_PCR.doc](http://www.upf.edu/sct/_pdf/genomica/en/Sequencing_PCR.doc)>
  - <[http://www.upf.edu/sct/\\_pdf/genomica/en/PURIFICATION\\_of\\_the\\_ddNTPS\\_non\\_incorporated\\_in\\_the.doc](http://www.upf.edu/sct/_pdf/genomica/en/PURIFICATION_of_the_ddNTPS_non_incorporated_in_the.doc)>

Consultat el dia 30/06/2014

- Servei de Control de Mosquits [en línia], <[http://www.elbaixllobregat.net/scm/index.asp?id\\_menu=339&v\\_id\\_departament=J&lang=ca](http://www.elbaixllobregat.net/scm/index.asp?id_menu=339&v_id_departament=J&lang=ca)>

Consultat el dia 09/07/2014

- Bold system [en línia], <[http://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine)>
- Consultat el dia 21/07/2014

- Blast [en línia], <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>
- Consultat el dia 21/07/2014

- The Canadian Centre of DNA Barcoding (CCDB) [en línia], <<http://ccdb.ca/>>
- Consultat el dia 12/09/2014



- Mafft [en línea], <<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>>  
Consultat el dia 17/09/2014
  
- *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrate*. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994.  
[en línea], <[http://www.mbari.org/staff/vrijen/PDFS/Folmer\\_94MMBB.pdf](http://www.mbari.org/staff/vrijen/PDFS/Folmer_94MMBB.pdf)>  
Consultat el dia 17/09/2014
  
- Mosquits i malalties [en línea],
  - o <[http://ca.wikipedia.org/wiki/Virus\\_del\\_Nil\\_occidental](http://ca.wikipedia.org/wiki/Virus_del_Nil_occidental)>
  - o <[http://ca.wikipedia.org/wiki/Mal%C3%A0ria#Control\\_dels\\_vectors](http://ca.wikipedia.org/wiki/Mal%C3%A0ria#Control_dels_vectors)>
  - o <<http://atrapaeltigre.com/web/ca/nota-informativa-sobre-la-chikungunya-malaltia-transmesa-pel-mosquit-tigre/>>
  - o <[http://serveicontrolmosquits.blogspot.com.es/2014\\_06\\_01\\_archive.html](http://serveicontrolmosquits.blogspot.com.es/2014_06_01_archive.html)>
  - o <<http://www20.gencat.cat/portal/site/canalsalut/menuitem.af261f715269a25d48af8968b0c0e1a0/?vgnnextoid=5f3f0998a4571310VgnVCM1000008d0c1e0aRCRD>>
  - o <[http://www.elbaixllobregat.net/mosquitigre/contingut.asp?id\\_menu=37](http://www.elbaixllobregat.net/mosquitigre/contingut.asp?id_menu=37)>
  - o <[http://www.irta.cat/ca-es/RIT/Noticies/pagines/CRSA\\_Recercaixa.aspx](http://www.irta.cat/ca-es/RIT/Noticies/pagines/CRSA_Recercaixa.aspx)>
  - o <[http://ca.wikipedia.org/wiki/Mosquit\\_tigre](http://ca.wikipedia.org/wiki/Mosquit_tigre)>Consultat el dia 25/10/2014

## 7. ANNEXOS

### INVENTARI MOSQUITS

#### ADULTS

01. Població: Sant Andreu de la Barca  
Lloc: Hotel Bristo (urbà i net)  
Data:25/06/14  
Espècie: *CULEX PIPIENS*
  
02. Població: Viladecans  
Lloc: Les tanques (net)  
Data:25/06/14  
Espècie:*CULEX PIPIENS*
  
03. Població: El prat  
Lloc: Dipòsit DSU (subterrani brut)  
Data: 25/06/14  
Espècie: *CULEX PIPIENS*
  
04. Població: El prat  
Lloc: Militars  
Data:26/06/14  
Espècie:*OCHLARATUS CASPIUS*
  
05. Població: El Prat  
Lloc: la Rilada  
Data: 26/05/14  
Espècie: *OCHLARATUS CASPIUS*
  
06. Població:El Prat  
Lloc: Militars  
Data: 26/06/14  
Espècie: *AE. ALBOFICTUS*
  
07. Població: Sant Vicenç dels Horts  
Lloc:Urbà  
Data:15/05/14  
Espècie:*CULEX PIPIENS*
  
08. Població: Sant Vicenç dels Horts  
Lloc: Urbà  
Data: 01/06/14

Espècie: *AE. ALBOPICTUS*

09. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data:13/06/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

10. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data:28/05/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

11. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 22/06/14

Espècie:*CULEX PIPIENS*

12. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 12/06/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

13. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 28/05/14

Espècie: *OCHLARATUS CASPIUS*

14. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 16/05/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

15. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 19/05/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

16. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 23/06/14

Espècie: *CULISETA LONGIAREOLATA*

17. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data:17/05/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

18. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 08/05/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

19. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data: 06/06/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

20. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Urbà

Data:20/05/14

Espècie: *CULISETA LONGIAREOLATA*

21. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Hort (a la vora del riu)

Data: 09/07/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

22. Població: Sant Vicenç dels Horts

Lloc: Hort (a la vora del riu)

Data: 09/07/14

Espècie: *OCHLARATUS CASPIUS*

23. Població: Torrelles de Llobregat

Lloc: Bosc

Data: 10/07/14

Espècie: *CULEX PIPIENS MASCLES*

24. Població: Torrelles de Llobregat

Lloc: Bosc

Data: 10/07/14

Espècie: *CULEX PIPIENS FEMELLES*

## LARVES

A. Població: Campelles (1300m)

Lloc: Abeurador

Data: 06/07/14

Espècie: *CULEX PIPIENS*

- B. Població: Campelles (1300m)  
 Lloc: Abeurador 2  
 Data: 06/07/14  
 Espècie: *CULEX PIPIENS* Y *CULEX TORRENTIUM*
- C. Població: Santa Coloma de Cervelló (Cesalpina)  
 Lloc: Balsa del bosc  
 Data: 10/07/14  
 Espècie: *CULISIETA LONGIAREOLATA*
- D. Població: Campelles (1300m)  
 Lloc: Abeurador 3(brut)  
 Data: 06/07/14  
 Espècie: *CULEX IMPUDICUS* Y *CULISETA LONGAREOLATA*
- E. Població: Delta del Ebre  
 Lloc: -  
 Data: Any 2000  
 Espècie: *ANOPHELES ATROPARVUS*
- F. Població: Sant Boi  
 Lloc: Laboratori: insectari  
 Data: Menys de 15 anys  
 Espècie: *AEDES AEGYPTI*
- G. Població: Viladecans  
 Lloc: -  
 Data: Menys de 10 anys  
 Espècie: *CULISETA LONGIAREOLATA*

■ = Mostres portades al laboratori per seqüenciar. Són les mostres que hem utilitzat per seqüenciar el DNA. Abans de fer-ne la seqüenciació desconexíem a quina espècie pertanyien.

A' = Totes les mostres ressenyades amb una lletra o numero amb ´ corresponen a rèpliques de la mostra inicial.

24 1 } Els dos dígits inicials corresponen al numero d'inventari i el tercer dígit significa que  
 24 3 } tot el treball de laboratori s'ha fet amb un o més mosquits. I l'absència d'aquest  
 tercer numero indica que la mostra contenia únicament un mosquit.