

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRIA EN ENTOMOLOGÍA



“Caracterización Molecular de 6 cepas del gusano barrenador del ganado
Cochliomyia hominivorax (Coquerel) y de la especie
Cochliomyia macellaria (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae)”.

CLAUDIA E. TOLEDO PERDOMO

TESIS SOMETIDA COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRA
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN ENTOMOLOGÍA AGRÍCOLA

Asesor principal Dr. Steven Skoda, Ph.D.

Panamá, República de Panamá

2007

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRIA EN ENTOMOLOGÍA

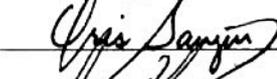
“Caracterización Molecular de 6 cepas del gusano barrenador del ganado
Cochliomyia hominivorax (Coquerel) y la especie
Cochliomyia macellaria (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae)”.

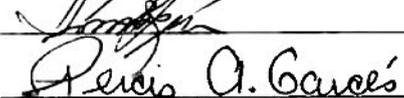
CLAUDIA E. TOLEDO PERDOMO

2007

APROBADO







57

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi eterno agradecimiento a Dios y la Virgen María, por sus múltiples bendiciones que he recibido y a mis padres **Julio** y **Bety** por el apoyo que me han brindado.

- 7 MAY 2007

Al comité de asesores **Doctor Steven Skoda**, **Doctora Oris Sanjur**, **Magister Ivan Luna** y **Magister Percis Garcés**.

De una manera muy especial, quiero dar mi profundo agradecimiento a la **Doctora Oris Sanjur**, del Instituto Smithsonian, por todo su apoyo incondicional y tiempo dedicado a esta investigación, además quiero resaltar mi agradecimiento por su calidad humana y su valiosa amistad.

Agradezco al **Doctor Steven Skoda**, de **ARS - USDA**, quien depositó su confianza en mi y me brindó la oportunidad de realizar esta investigación, además de su gran apoyo.

autor

A los profesores **Doctora Yolanda Águila**, **Magister Iván Luna** y **Magister Percis Garcés** por todo su apoyo durante todo el tiempo de mi desempeño en la maestría.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico -**DAAD**- por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de maestría, especialmente a **Magister Neddy Zamora**.

DEL

Al **Doctor Eldrege Bermingham** por darme la oportunidad de realizar mi investigación en el laboratorio de Biotecnología del Instituto Smithsonian.

BBSE 0010

A la **Doctora Laura Geyer**, **Grethel Grajales**, **Maribel Gonzáles**, **Carlos Vergara**, **Mabelle Chong**, **Eyda Gómez** y **Javier Jara** del laboratorio de Biotecnología del Instituto Smithsonian. Así también a **Jorge Castillo**, **Gladys Quinteros** y **Mario Vásquez** del laboratorio de Investigación del gusano barrenador del ganado **ARS-USDA**; y finalmente a **Ricardo Rovira** y **Rolando Torres** del Instituto Conmemorativo Gorgas. A Todos ellos por su amistad y apoyo.

5286

Índice General

Índice de Figuras	1
Índice de Cuadros	ii
Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Revisión de literatura	9
1. Descripción taxonómica y biológica del gusano barrenador del ganado -GBG – <i>C. hominivorax</i>	10
2. Aspectos ecológicos en el comportamiento del GBG <i>C. hominivorax</i>	12
3. Distribución geográfica del GBG <i>C. hominivorax</i>	13
4. Descripción taxonómica y biológica de <i>Cochliomyia macellaria</i>	14
5. Principales características utilizadas para diferenciar <i>C. hominivorax</i> de <i>C. macellaria</i>	16
6. Miasis	17
6.1. Signos clínicos	19
7. Miasis en humanos	20
8. Importancia económica	21
9. Métodos de control y erradicación	22
9.1. Sacrificio y tratamientos químicos	22
9.2. Producción masiva en laboratorio	22
9.3. Técnica del insecto estéril - TIS -	23
9.4. Programa de erradicación del gusano barrenador del ganado	25
10. Análisis moleculares	26
10.1 El ADN mitocondrial de los insectos	26
10.2 El ADN mitocondrial de <i>Cochliomyia hominivorax</i>	27
10.3 Técnicas moleculares utilizadas	28
15. Estudios genéticos realizados de <i>C. hominivorax</i> y <i>C. macellaria</i>	31
15.1. Estudios para <i>C. hominivorax</i>	31
15.2. Estudios para <i>C. macellaria</i>	33
16. Características ecológicas de los lugares de origen de las cepas de <i>C. hominivorax</i>	34
16.1 Oaxaca, México	34
16.2 Quintana Roo, México	34
16.3 Chiapas, México	35
16.4 Oeste de San José, Costa Rica	36
16.5 Norte de la Ciudad de Panamá, Panamá	36
17. Descripción de la crianza de las cepas	37
18. Características de área de colecta de <i>C. macellaria</i>	38
Materiales y métodos	39
1. Material biológico	40
2. Colecta de <i>C. macellaria</i>	42
3. Extracción del mtADN	43
4. Amplificación de PCR	44
5. Evaluaciones para cada Cebador	45

5.1	Cebador 3	45
5.2	Cebador 4	47
5.3	Cebador 7	48
5.4	Cebador 8	49
5.5	Cebador 9	49
5.6	Cebador 10	50
6.	PCR para cada Cebador	51
7.	Visualización de PCR	51
8.	Preparación para cortar bandas	52
9.	Secuenciación en ciclo (cycle sequencing)	52
10.	Columnas de Sephadex	53
11.	Optimización de protocolos de PCR para <i>Cochliomyia macellaria</i>	53
11.1.	Cebador 7	53
11.2	Cebador 8	53
11.3	Cebador 9	54
11.	Regiones amplificadas	55
12.	Análisis filogenéticos	55
	Resultados	57
1.	Optimización de los cebadores para <i>C. hominivorax</i>	58
2.	Optimización de los cebadores para <i>C. macellaria</i>	58
3.	Tamaño de las regiones amplificadas	58
4.	Relaciones filogenéticas de las cepas	58
4.1.	Cebador 7	58
4.2.	Cebador 8	60
4.3.	Cebador 9	60
4.4.	Consenso	60
	Discusión	66
1.	Regiones amplificadas	67
2.	Caracterización molecular de las cepas de <i>C. hominivorax</i> y <i>C. macellaria</i>	67
3.	Relación molecular entre las 6 cepas de <i>Cochliomyia hominivarax</i>	69
	Conclusiones	76
	Recomendaciones	78
	Literatura citada	80
	Anexo	88
	Anexo 1	89
	Anexo 2	91

Índice de Figuras

Figura 1.	Representación circular de mtDNA de <i>C. hominivorax</i>	28
Figura 2.	Jaulas de reproducción de las moscas y bandejas con pupas, laboratorio de ARS-USDA, Pacora, Panamá.	38
Figura 3.	Localización geográfica del origen de las cepas evaluadas	41
Figura 4.	Árbol filogenético de las cepas <i>C. hominivorax</i> de la región NADH5, mtADN	62
Figura 5.	Árbol filogenético de las cepas <i>C. hominivorax</i> de la región NADH4/NADH5, mtADN	63
Figura 6.	Árbol filogenético de las cepas <i>C. hominivorax</i> de la región NADH4 mtADN	64
Figura 7.	Árbol filogenético de las cepas <i>C. hominivorax</i> del consenso, región NADH4 -NADH5, mtADN	65

Índice de Cuadros

Cuadro 1.	Principales características para diferenciar <i>C. hominivorax</i> y <i>C. macellaria</i> .	16
Cuadro 2.	Latitud, longitud y año de colecta de las cepas de <i>C. hominivorax</i> y la especie <i>C. macellaria</i> .	40
Cuadro 3.	Principales características de las cepas de <i>C. hominivorax</i> .	40
Cuadro 4.	Principales características para diferenciar a los adultos de <i>C. hominivorax</i> de <i>C. macellaria</i> en el campo	42
Cuadro 5.	Cebadores utilizados en la investigación.	45

RESUMEN

El gusano barrenador del ganado, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) es una plaga de importancia económica para animales de sangre caliente, principalmente el ganado vacuno. El programa Agriculture Research Service (ARS) de USDA tiene identificados a 6 cepas procedentes de México, Panamá y Costa Rica, las cuales fueron caracterizadas molecularmente. Para ello se optimizaron 3 cebadores de 6 que fueron evaluados. Por medio del método de secuenciación cíclica se obtuvieron las regiones del genoma mitocondrial NADH4 –His tRNA – NADH5. Para establecer las relaciones filogenéticas se realizaron los análisis de Parsimonia, NJ, Máxima Verosimilitud y Bayesiano, mostrando la misma topología de la formación de 4 clados definidos. El primero formado por las cepas de Oaxaca y Quintan Roo, el segundo por las cepas procedentes de Chiapas, el tercero por las cepas de Costa Rica y Panamá y el cuarto por una población de Brasil, la cual fue obtenida de GenBank. En la investigación también se incluyó a la especie *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), donde se evaluaron los tres cebadores que se optimizaron para *C. hominivorax*, de los cuales se lograron optimizar dos, amplificando la región de NADH4 y una pequeña región de NADH5. Con esta región ampliada es posible la diferenciación molecular con *C. hominivorax*.

SUMMARY

The screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) is an important pest which parasitizes livestock and other warm-blooded animals. The Agriculture Research Service (ARS) of the USDA identified 6 lines from Mexico, Panama and Costa Rica, which have been characterized molecularly. Six primers were evaluated and three were optimized and successfully amplified. Using cycle sequencing we obtained sequences from the regions NADH4 - His tRNA - NADH5. We used Parsimony, NJ, Maximum Likelihood and Bayesian methods to analyze the phylogeny of the six lines and another population from Brazil. These analyses resulted in singular topologies with four clades: the first consisting of the lines from Oaxaca and Quintana Roo, the second clade consisting of the lines from Chiapas, the third clade with the lines from Costa Rica and Panama and fourth clade formed by one population from Brazil, which we obtained from GeneBank. We also included *Cochliomyia macellaria* (Fabricius). We evaluated three primers and successfully amplified and optimized two. We obtained sequences from NADH4 and part of NADH5. It is possible to differentiate between *C. hominivorax* and *C. macellaria* using this region.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El gusano barrenador del ganado (GBG), *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), es una plaga de importancia económica para animales de sangre caliente, principalmente el ganado vacuno y también afecta a los humanos. Desde 1965 los gobiernos de Estados Unidos y México iniciaron acercamientos a fin de compartir acciones para contrarrestar los efectos del gusano barrenador. En 1966 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos declara a la nación libre del gusano barrenador del ganado, asumiendo la responsabilidad de mantener una barrera biológica a lo largo de las dos mil millas que comprenden la frontera de México y Estados Unidos con el objetivo de prevenir una nueva migración del gusano barrenador que reinfestara el territorio norteamericano. En 1972 se concretó la colaboración conjunta para la erradicación del gusano barrenador del ganado. Para esto fueron necesarios 19 años para erradicarlo en México, por lo que en 1991 este país fue declarado oficialmente libre de esta plaga, siendo necesario la dispersión de 250 mil 631 millones de moscas estériles. Los avances en la campaña de erradicación en México definieron el establecimiento de una nueva barrera biológica entre México y Estados Unidos en 1999 (Elizalde, 2005).

Posteriormente, el Programa se ha extendido con el propósito de abarcar todo el Istmo Centroamericano, incluyendo Panamá, hasta llegar al Tapón de Darién. Mediante esta nueva etapa del Programa de Erradicación del Gusano Barrenador se iniciaron los programas de Guatemala en 1987, Belice en 1989, El Salvador y Honduras en 1991, Nicaragua 1992 y Costa Rica en 1995. El avance del Programa hizo posible la erradicación del gusano en Belice y Guatemala (1994), El Salvador (1995), Honduras

(1996) y Nicaragua (1999), Costa Rica (2000) (Embajada de Estados Unidos, Costa Rica, 2005).

Las operaciones aéreas y de campo en Panamá iniciaron en 1998 y el avance en el programa de erradicación del gusano barrenador del ganado ha sido significativo. Para septiembre de este mismo año se registraron más de dos mil casos del gusano barrenador. Para el año 2004 ya las tres cuartas partes del territorio panameño se declararon técnicamente libres de este insecto. En el 2005, un segundo caso de GBG ocurrió en Metetí-Darién, identificado el 9 de junio del 2005 (COPEG, 2005; Embajada de Estados Unidos en Panamá, 2005). Finalmente, en julio de 2006 Panamá fue declarado libre del gusano barrenador del ganado.

El costo del Programa para la Erradicación del Gusano Barrenador en Centroamérica ha sido de aproximadamente 200 millones de dólares y en Costa Rica de 41 millones. La relación de costo - beneficio de este programa en Costa Rica estuvo entre 4.8 y 12.8. Si el programa costó 41 millones de dólares, se obtuvieron entre 168 y 448 millones de dólares en beneficios. Después de erradicado el gusano barrenador de Costa Rica, los beneficios directos a los productores costarricenses se estimaron en más de 13 millones de dólares por año. Los dos gobiernos compartieron los costos, de igual manera que se hizo con los otros países centroamericanos 85 % de los costos los cubrió el gobierno de los Estados Unidos de América y 15 % cada uno de los países centroamericanos (Embajada de Estados Unidos en Costa Rica, 2006).

En la actualidad el gusano barrenador del ganado se encuentra presente en algunos países del Caribe como Cuba, República Dominicana, Haití, Jamaica, Trinidad y Tobago y en América del sur, exceptuando Chile, afectando la sanidad pecuaria y pública, además de la economía de esas regiones, donde la población ganadera es de 463,392 millones (bovinos, equinos, suinos, ovinos, caprinos). Con respecto a la población humana, existen 330,570 millones de personas en riesgo de ser atacados por el gusano barrenador del ganado (FAO, 2005a). Asimismo, esta situación continúa poniendo en riesgo de nuevas infestaciones a los países donde la plaga ya ha sido erradicada.

Una de las actividades importantes del programa de erradicación del gusano barrenador del ganado es su correcta identificación. En estudios realizados se han encontrados diferencias morfológicas entre individuos de distintas poblaciones del gusano barrenador del ganado como la variación del color de cuerpo y de los ojos, anomalías de la venación de las alas y otras diferencias morfológicas. Estas variaciones podrían influir en el vuelo, la visión, comportamiento, vigor, longevidad, etc., además de poner en duda su correcta identificación. Así, según Baumhover (1966) para confirmar la identificación y separación de la plaga en estudios ecológicos o separar las especies de poblaciones nativas es necesario el desarrollo de marcadores genéticos para adultos. El estudio de los genomas mitocondriales (mtADN) se ha venido incrementando, debido a que estos aportan información genética que puede ser usada en investigaciones moleculares y de evolución. Estudios realizados por Litjens *et al.* (2001) demostraron que en el gusano barrenador del ganado basando el análisis específico en las regiones mtDNA

facilitan el potencial de acercamiento para la identificación taxonómica y relaciones entre poblaciones.

Actualmente el Servicio de Investigación Agrícola –ARS- del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos –USDA- poseen 6 cepas del gusano barrenador del ganado, las cuales presentan algunas diferencias morfológicas. Estas cepas son procedentes de México, Costa Rica y Panamá. Su caracterización molecular, por medio de las secuencias del mtADN ayudará a demostrar si existe alguna relación filogenética entre ellas.

Cochliomyia macellaria (Fabricius) es una especie muy común en el neotrópico de América, con un rango de distribución comprendido desde el sur de Canadá hasta Argentina. Es considerada como una plaga secundaria de miasis en el ganado, alimentándose principalmente de tejidos muertos (Litjens *et al.* 2001). Su distribución geográfica se traslapa con la de *C. hominivorax* además que morfológicamente son muy similares. Además del alto parecido morfológico entre los adultos de ambas especies, también lo es en el estado inmaduro; es decir, en los distintos estadios larvales, que en determinado momento resulta muy difícil identificarlas. Esto representa un problema para el programa de erradicación del Gusano Barrenador del Ganado, debido a que las liberaciones de moscas estériles, declarar una zona libre, una zona infestada o una zona re-infestada dependerá de la correcta identificación de *C. hominivorax*. Una liberación errónea en zonas donde ya no está la plaga representa un alto costo para el programa. Debido a lo anterior es importante caracterizar molecularmente a las especies

Cochliomyia hominivorax y *Cochliomyia macellaria* porque esto aportará información que posteriormente facilitará la separación entre ambas especies en las muestras de las larvas colectadas en el campo y así permitirá tomar decisiones para el manejo del programa de erradicación del ganado como por ejemplo realizar liberaciones de *C. hominivorax* solo cuando realmente sean necesarias.

El presente trabajo tiene como objetivos: determinar la relación molecular entre las 6 cepas evaluadas de *Cochliomyia hominivorax*. Para cumplir con este objetivo se realizaron los análisis filogenéticos de Neighbor Joining (NJ), Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) y el Análisis Bayesiano. Asimismo, caracterizar molecularmente cada una de las cepas de *Cochliomyia hominivorax* y *Cochliomyia macellaria* por el método de secuenciación cíclica. Finalmente, optimizar el protocolo para PCR y el programa para el termociclador utilizado por Maliphan *et al.* (2006) para cada uno de los 6 cebadores utilizado en la investigación.

Revisión de Literatura

El género *Cochliomyia* posee cuatro especies: *C. aldrichi*, *C. hominivorax*, *C. macellaria* y *C. minima*; de las cuales la que presenta mayor importancia económica por su impacto sanitario en animales mamíferos y los seres humanos es *C. hominivorax*, muy conocida comúnmente como el gusano barrenador del ganado, GBG (Hall, 1973 y Cunningham, 1993).

I. DESCRIPCIÓN TAXONOMICA Y BIOLOGICA DEL GUSANO BARRENADOR DEL GANADO –GBG– *C. hominivorax*

Phylum:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden :	Diptera
Suborden:	Cyclorrhapha
Superfamilia:	Muscoidea
Familia:	Calliphoridae
Género:	<i>Cochliomyia</i>
Especie:	<i>Cochliomyia hominivorax</i> (Coquerel).

Cochliomyia hominivorax es un parásito obligado de los mamíferos, siendo especie endémica en las regiones del trópico y sub-trópico del continente americano (Norte, centro, sur América e islas del caribe). La temperatura templada es la que presenta las condiciones óptimas para su desarrollo; sin embargo las sequías prolongadas, temperaturas altas o muy bajas son condiciones sub-óptimas. La actividad de los adultos de *C. hominivorax* decrece cuando la temperatura está por debajo de los 21°C y no pueden sobrevivir cuando la temperatura es menor de los 9°C por un período de 3 meses

consecutivos o 12°C por 5 meses consecutivos durante el año (Erziclioglu, 1987 y Jasiorowski, 1993). Los adultos poseen un alto poder de vuelo y dispersión, los cuales se han reportado en moscas que han alcanzado una dispersión hasta de 290 Km en dos semanas (Jasiorowski, 1993).

Según Baumhover (1966) y Drugueri (2004), el ciclo de vida de *C. hominivorax* dura en total aproximadamente de 3 semanas a 2 meses, dependiendo de la temperatura y de la humedad. Se ha demostrado que el ciclo es más corto en verano. Las hembras ovipositan en los bordes de las heridas, ombligos de los neonatos, mordeduras, mucosas lesionadas, orbita ocular, orejas, etc., las cuales son atraídas por el olor de la sangre del animal. Estas pueden ovipositar en grupos de 200 a 500 en líneas que se superponen como tejas en el borde de una herida. Las masas de huevos tardan entre 12 y 21 horas para que eclosionen las larvas, pasando por tres estadios, dentro del tejido subcutáneo del hospedero. Las larvas permanecen sobre el hospedero sólo de 5 a 7 días, luego caen al suelo, donde se transforman en pupa y dependiendo de la temperatura, entre 1 a 8 semanas emergen los adultos (imago). Los estudios han demostrado que las pupas pueden sobrevivir un mes a una temperatura de -5°C, mostrando un 70% de eclosión. Estudios más recientes indican que pueden permanecer de 45 a 50 días vivas a intervalos continuos a esta temperatura.

En cuanto a los adultos, menos del 1% de los mismos sobrevivieron una noche a temperatura de -6.7°C (Cunningham, 1993; Krafur y Lindquist, 1996). A la edad de 3 ó 4 días de vida las hembras copulan y comienzan a alimentarse. Dos días después

empiezan a depositar los huevos. Con clima cálido el ciclo total dura 21 días (Baumhover, 1966; Drugueri, 2004).

Crystal (1967) y Adams (1979) reportan que la edad de apareamiento de las hembras es únicamente del tercero al quinto día. Las hembras incrementan gradualmente su receptividad para aparearse desde el 3 al 14 día, ovipositan aproximadamente 200 huevos, en donde la condición nutricional de la hembra y los factores ambientales son influyentes en esta cantidad.

2. ASPECTOS ECOLÓGICOS EN EL COMPORTAMIENTO DEL GBG, *C. hominivorax*

Según Thomas (1993), esta especie es un parásito obligado, causante de una miasis. Los adultos se localizan entre los arbustos de una zona boscosa en donde reposan y se alimentan. Los árboles que están floreciendo son los preferidos, alimentándose del néctar y miel, los cuales son necesarios para que el adulto sobreviva. En general Thomas y Mangan (1989) demostraron la preferencia de la mayor cantidad de moscas en zonas boscosas que en los pastizales abiertos. Entre el tercer y cuarto día de edad las hembras llegan a ser sexualmente activas y el apareamiento ocurre generalmente cuando los machos se agregan en algún sitio seleccionado de acuerdo al camino utilizado normalmente por las hembras. Al quinto día de edad las hembras están listas para la oviposición. La fase de apareamiento es la que reporta la mayor mortalidad debido a que en este momento están distraídas y son presa fácil de hormigas y otros deperedadores y oportunistas.

En cuanto a la dinámica poblacional de los adultos de *C. hominivorax*, Krafur (1987) reporta que existe una relación con veranos calientes y húmedos asociados a la abundancia de las poblaciones de *C. hominivorax*, indicando la preferencia de estos especímenes a dicho clima. Así también, estudios realizados por Gomes *et al.* (1998), en Brasil, demostraron que en los meses donde se registraron medias de temperaturas máximas de 29.7°C en enero y 29.3°C en febrero, combinadas con precipitación de 364.2mm y 185.0 mm, respectivamente, hubo disminución de la población de *C. hominivorax*. Sin embargo, para el mes de marzo, donde se registró una temperatura máxima de 30.1°C y una precipitación de 165.1 mm aumentó la población, por lo que consideran que el nivel poblacional está asociado a la temperatura y la precipitación, en donde a medida que aumenta la precipitación disminuye la población. Así también, las influencias de la vegetación y su relación con el nivel poblacional de las moscas lo demostraron Gomes *et al.* (1998), al obtener mayor captura en los lugares que presentaban mayor cantidad de árboles, sugiriendo que estas moscas tienen preferencia hacia lugares con mayor cantidad de árboles o arbustos.

3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GBG *C. hominivorax*

C. hominivorax, es nativa de las regiones tropicales y subtropicales del continente americano. Previo a la erradicación, su distribución original estaba comprendida entre la región de los paralelos 30° norte y 30° sur, abarcando el centro y sureste de los Estados Unidos, México, Centro América, Panamá, las islas del Caribe y Sur América. En la actualidad el gusano barrenador del ganado se encuentra presente en forma endémica en América del Sur, excepto en Chile. También está presente en algunos países del Caribe

como Cuba, Republica Dominicana, Haití, Jamaica, Trinidad y Tobago, poniendo en riesgo una población ganadera susceptible de más de 515 millones de animales (FAO, 2005c).

4. DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA Y BIOLÓGICA DE *Cochliomyia macellaria*

Phylum:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden :	Diptera
Suborden:	Cyclorhapha
Superfamilia:	Muscoidea
Familia:	Calliphoridae
Género:	<i>Cochliomyia</i>
Especie:	<i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius).

Cochliomyia macellaria (Fabricius) es una de las principales especies que causan miiasis cutánea secundaria. Su distribución original se limita al continente americano desde México hasta la Patagonia y en la región ártica hasta el sur de Canadá (Guimaraes, 1983).

Debido al hábito necrófago de las larvas, los adultos generalmente están asociados con tejidos muertos junto con otras especies de las familias Caliphoridae, Sarcophagidae y Muscidae. Económicamente, esta especie es menos importante que *C. hominivorax*; sin embargo, *C. macellaria* también es encontrada parasitando tejidos necrótico en mamíferos vivos, contribuyendo con la gravedad de la lesión ya existente en el mamífero.

Sin embargo, no se desarrolla en zonas profundas de los tejidos vivos como lo hace *C. hominivorax* (Cunninghaim, 1993).

La longevidad de los adultos es de dos a seis semanas, encontrándolos con frecuencia visitando carroña, animales muertos, depósitos de basura, frutos caídos, peces expuestos en mercados, etc. (Guimaraes, *et al.* 1978; Byrd, 1995). Las hembras ovipositan hasta 1,000 huevos en lotes de 40 a 250. En condiciones óptimas los huevos eclosionan dos horas después de ser ovipositados y el período de desarrollo larval es de aproximadamente de 6 a 20 días. Posteriormente, las larvas caen al suelo, donde pupan y permanecen en este estado durante un período de 3 a 27 días. Finalmente, el período total de desarrollo de huevo a adulto es de 39 días (FAO, 1993).

La selectividad de la distribución en el campo, cerca de carroña o animales muertos responde en mayoría a las hembras con un 90%, debido a que estas buscan un substrato para la oviposición. Un estudio realizado por Gomes *et al.* (2000) en Brasil, reporta la presencia de *C. macellaria* todos los meses del año, coincidiendo el incremento de la población con el aumento de la temperatura y el inicio de las lluvias. Los picos poblacionales se presentaron en los meses de septiembre, octubre y diciembre durante el periodo lluviosos y disminuyeron durante la época seca, en los meses de junio y julio. Así también, Butler (1996) realizó estudios de laboratorio con *C. macellaria*, indicando que la temperatura óptima para las larvas fue de 39°C. En el desarrollo del huevo a adulto se evaluaron 3 temperaturas: 21°C, 26°C y 32.2°C mostrando mayor preferencia por las altas temperaturas.

5. PRINCIPALES CARACTERISTICAS UTILIZADAS PARA DIFERENCIAR *C. hominivorax* DE *C. macellaria*

Cuadro 1. Principales características para diferenciar *C. hominivorax* y *C. macellaria* (Cunninghaim, 1993).

	<i>C. hominivorax</i>	<i>C. macellaria</i>
Huevo	Depositados en masas en forma de tejados	Depositados en masas irregulares
Huevo	La sutura dorsal extendiéndose desde el micrópilo hasta casi el extremo posterior.	La sutura dorsal se extiende desde el micrópilo abarcando el 80% del huevo.
Larvas Primer Instar	Esclerito dorsofaríngeo pequeño	Esclerito dorsofaríngeo grande
Larvas Segundo Instar	Troncos traqueales dorsales con pigmentación oscura.	Troncos traqueales dorsales no tan pigmentados.
Larvas Tercer Instar	Troncos traqueales dorsales de los estigmas posteriores con una pigmentación oscura desde la unión con los estigmas hacia delante hasta el segmento 9 ó 10.	Troncos traqueales dorsales pigmentados en la cuarta parte posterior del último segmento, donde se unen con los estigmas posteriores.
Pupa	Aproximadamente 10.2 mm de longitud y 4.3 mm de ancho	Aproximadamente 7.6 mm de longitud y 2.8 mm de ancho
Adultos	Placas frontoorbitales con setas negras. Basicosta de la hembra de color pardo oscuro. Las hembras tienen en la parte posterior de la cabeza una franja anaranjada rojiza. En los machos esta mancha es pequeña. En la parte ventral del abdomen, en el tercer y cuarto segmento, en los bordes laterales no tienen manchas blancas, solamente puntos blancos.	Placas frontoorbitales con setas de color claro. Basicosta de la hembra de color amarillo. En la parte posterior de la cabeza, los dos sexos tienen una mancha negra. En los bordes de la parte ventral del abdomen, en el tercer y cuarto segmento, presenta manchas blancas.
La herida	Las larvas producen una herida profunda, en forma de bolsa, alimentándose de manera gregaria de los tejidos vivos, situadas con la cabeza hacia abajo y sin moverse mucho en la superficie de la herida.	En los casos de miasis, las larvas se alimentan de tejidos necróticos, alrededor de los bordes de la herida. En los animales de pelo largo por la lana o pelo que la rodea, no producen una herida en forma de bolsa.

6. MIASIS

Esta palabra proviene del griego *myias* (*myia*= mosca; *ase* = enfermedad), que significa enfermedad causada por moscas. Representando la infestación de tejidos de animales vertebrados por larvas de mosca. La ecología de la miasis es definida como el conjunto de interacciones biológicas entre el huésped y los parásitos, causando una infestación sobre animales y humanos por las larvas de algunas moscas (Diptera) de las familias Calliphoridae, Sarcophagidae, Oestridae, Muscidae, Phoridae y Fannidae (Poudevigne, 1995; Enciclopedia Microsoft Encarta, 2004; Boros, *et al.* 2006). Dentro de las especies causantes de miasis se encuentran *C. hominivorax*, *Chrysomya bezziana* y *Wohlfahrtia magnifica* (Jasiorowski, 1993).

Dos especies de *Cochliomyia* se encuentran asociadas a miasis, *C. hominivorax* y *C. macellaria*. Sin embargo, en un principio, erróneamente *C. macellaria* ha sido implicada como causante de miasis primaria durante muchos años, confundiéndola con *C. hominivorax*. Las larvas de *C. macellaria* pueden ser muy abundantes en carroña. Cuando estas se encuentran en miasis, son solamente invasoras en tejidos secundarios, encontrándose en la superficie de la herida. Es vital para establecer un control una correcta identificación del insecto causante del daño (Poudevigne, 1995; Boros, *et al.* 2006).

En función del parásito que provoca la infección se distinguen tres tipos de miasis (FAO 2005b).

- a. **Miasis Obligatoria:** moscas cuyo desarrollo larvario tiene lugar íntegramente sobre los vertebrados vivos.

- b. **Miasis Facultativa:** mosca cuyas larvas se alimentan de carroña, pero, que ocasionalmente pueden parasitar animales vivos.
- c. **Miasis Accidental:** larvas de ciertas moscas que siendo habitualmente coprófagas o saprófagas pueden llevar a cabo la oviposición sobre los alimentos, siendo capaces de resistir la acción de los jugos gástricos y alcanzar el intestino.

Desde el punto de vista clínico, según Jasiorowski (1993) las miasis se pueden agrupar en:

- a. **Miasis Cutánea:** las larvas perforan la piel para alimentarse de la sangre del hospedero (hematófagas). En otras especies de moscas las larvas atraviesan la piel sana provocando un forúnculo o excavan galerías y túneles en la epidermis o tejidos más profundos, provocando graves daños en el hospedero. En otros casos, los adultos son atraídos por las heridas abiertas del futuro hospedero, depositando sobre estas los huevos. Generalmente, la herida se torna circular y muy profunda de aproximadamente 5 a 10 cm de profundidad o más, resultando en un extenso tejido destruido por las larvas. Estas heridas tienen un característico olor a putrefacción. Las larvas de *C. hominivorax* se encuentran en las partes profundas de la herida, a diferencia de las especies de daño secundario que se encuentran cercanas a la superficie.
- b. **Miasis de las cavidades corporales:** moscas que ovipositan en las cavidades nasofaríngeas y oculares y en los conductos auditivos.

c. **Miasis intestinales y urogenitales:** infestaciones accidentales de esas zonas al ingerir larvas o al penetrar estas por el recto. Ciertos adultos son atraídos por zonas infestadas o sucias, infestando las larvas el tracto urogenital.

Según Poudevigne (1995), las características necesarias de la herida para que se desarrollen las larvas de *C. hominivorax* son: tener una tasa alta de humedad y un pH de 7.2 como una condición mínima para la oviposición y para el desarrollo de las larvas. El pH óptimo se ubica a 7.6 y se encuentra en miasis de tipo 3 o en herida con fuerte contaminación por bacterias proteolíticas.

Los efectos patológicos que se producen de la infestación del gusano barrenador del ganado pueden ser (Poudevigne, 1995):

- Efecto traumático causado por las larvas al alimentarse del tejido del animal;
- Efecto de irritación causado por el movimiento de las larvas dentro de la herida.
- Infección secundaria causada en la herida por otros organismos contaminantes como bacterias, virus, protozoos u hongos.
- Efectos tóxicos a través de la excreción de las larvas.

6.1. Signos Clínicos

Las infestaciones comienzan en cualquier lesión abierta incluyendo algunas tan pequeñas como las picaduras de garrapatas. Las hembras grávidas depositan sus huevos en los bordes de las heridas. Las primeras larvas se mueven inmediatamente hacia la herida y comienzan a alimentarse. En las primeras etapas es extremadamente difícil

detectar las larvas en la herida por su pequeño tamaño. Estas se hacen visibles sólo por ligeros movimientos en la superficie de la herida (FAO, 2005a).

Después del tercer día de la infestación la herida se va haciendo significativamente más grande por las larvas. Estas se pueden notar fácilmente alimentándose en posición vertical a la herida con sus espiráculos expuestos en la superficie y generalmente puede ser diferenciada de otras larvas de moscas por su comportamiento en la herida. Las larvas se encuentran normalmente profundamente en los tejidos del huésped y no en la superficie de la herida (FAO, 2005a).

En el quinto día la lesión es obvia, con grandes larvas de tercer estadio. La herida tiene olor fétido característico del gusano barrenador del ganado y con un exudado oscuro. En esta etapa la herida está mayormente predispuesta para subsecuentes oviposiciones de otras hembras, contribuyendo así, a una mayor debilidad y la posible muerte del animal (FAO, 2005a).

7. MIASIS EN HUMANOS

Desde 1935 se han venido reportando casos de miasis en humanos. A pesar que existe poca información y divulgación de miasis en humanos es muy importante alertar a la población humana que viven en áreas donde se encuentra la plaga del gusano barrenador del ganado. Se ha demostrado que los casos en humanos han sido prevalentemente en las poblaciones de grupos socioeconómicos bajos. Se han encontrado casos donde se inicia la miasis por heridas, en mucosas con producción de secreciones y otros donde los seres humanos han ingerido accidentalmente larvas de

dípteros en los alimentos. Otras larvas se desarrollan dentro de ella y pasan al ser humano que las ingiere. Algunas de estas larvas, con cutícula muy resistente a los jugos digestivos, son capaces de pasar a través del tracto digestivo y emerger vivas por el ano (FAO, 2005a).

También se han presentado casos donde la miasis causa deformaciones anatómicas permanentes (FAO, 2005 b). En la actualidad en Medellín, Colombia, se han reportado 24 casos entre el año 2001 al 2005 en un hospital de tercer nivel, presentándose los casos en las mucosas, oídos y el cerebro (Valderrama, 2006).

La miasis en humanos ha sido clasificada clínicamente según las cavidades infestadas en los humanos: estomatomiasis, nasomiasis, rinomiasis, otomiasis (Boros, *et al.* 2006).

8. IMPORTANCIA ECONÓMICA

El gusano barrenador del ganado (GBG), *Cochliomyia hominivorax* se le considera una zoonosis; es decir, una enfermedad de los animales que puede ser transmitida a los humanos. No obstante, los efectos de este problema en la producción pecuaria resultan verdaderamente dramáticos. Las pérdidas económicas que se originan con la infestación del gusano barrenador implican anualmente cientos de millones de dólares. En los Estados Unidos previo a la erradicación, las pérdidas anuales eran de aproximadamente US\$ 650 millones. El impacto de esta plaga en los animales es inmediato: presentan disminución de peso, se deteriora la producción láctea y cárnica, muestran daños en pieles y presentan infecciones en las heridas por bacterias

oportunistas. En algunas ocasiones llevan al animal a la muerte a través de la anorexia, pérdida de peso, anemia y hemorragia, etc. Aunque existen tratamientos para revertir el problema, en la mayoría de los casos la solución implica el sacrificio e incineración del animal; además, de los costos constantes de la vigilancia y el tratamiento. En el año 2002 las pérdidas ocasionadas por las gusaneras del gusano barrenador del ganado en Brasil fueron de 150 millones de dólares (Crozarior, 2005).

9. METODOS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN

9.1. Sacrificio y Tratamientos Químicos

Inicialmente se aplicó el control de la plaga mediante el empleo de tratamientos químicos como lo son los insecticidas para matar la larva de la mosca y como medida preventiva para evitar la reinfestación. En casos extremos algunos productores optaron por el sacrificio de los animales (Jasiorowsky, 1993).

9.2. Producción Masiva en Laboratorio

El gusano barrenador del ganado fue reproducido artificialmente por primera vez utilizando una dieta artificial para las larvas, que básicamente consistía en una mezcla de leche, sangre, carne sin grasa y formalina. Para la colonia de adultos, se colocan en jaulas, se alimentan con agua, miel y huevo molido (Baumhover, *et al.* 1969). Estudios posteriores para la dieta de los adultos, han utilizando miel, producto del huevo deshidratado y otra con miel y proteína de carne (Chaudhury, 2000). Actualmente se producen masivamente en laboratorio con dieta artificial para larvas basada en leche,

sangre de ganado bovino, agua, huevo disecado y molido, fibra y formalina. La fábrica de producción de la mosca estéril del gusano barrenador del ganado estuvo ubicada desde 1976 en Tuxtla Gutiérrez, México, produce aproximadamente 500 millones de moscas por semana (Anderson y Leppla, 1992) y en el año 2006 fue trasladada a Pacora, Panamá.

9.3. Técnica del Insecto Estéril - TIS -

La técnica del insecto estéril puede ser descrita de la forma más simple como una forma de control de la natalidad. En 1937, el doctor E. F. Knipling fue el primero en proponer la erradicación del gusano barrenador del ganado a través de la esterilización de los machos, para que luego de su liberación en el campo estos se apareen con las hembras nativas. En 1951 Bushland y Hopkins esterilizaron moscas del gusano barrenador del ganado con 5 kv de rayos X o radiación gamma (60 Co) administrado a pupas de 5 días de edad (Baumhover, 1966). Las primeras experiencias de liberaciones de la mosca del gusano barrenador del ganado en campo se realizaron en el sureste de Estados Unidos de América, y posteriormente en la isla de Curaçao. Los estudios han demostrado que la dosis de esterilización de rayos X y rayos gamma administradas al gusano barrenador del ganado puede afectar seriamente la longevidad de los machos o su competitividad bajo condiciones de laboratorio (Baumhover, 1966).

Según Knipling (1983), biológicamente el gusano barrenador del ganado presenta las siguientes características a considerar en la aplicación de la técnica del insecto estéril como herramienta del control autocida:

- a. Es principalmente un insecto tropical y los estudios han demostrado una merma en su población en los meses de invierno.
- b. Las hembras presentan un comportamiento monógamo para aparearse.
- c. Las larvas pueden infestar y madurar en un amplio rango de hospederos.

La técnica del insecto estéril requiere semanalmente una producción de millones de insectos producidos en laboratorio, para posteriormente ser tratados con radiación X o gamma para su esterilización, utilizando Cesium 137. Luego del tratamiento, los insectos son dispersados en las áreas destinadas para la erradicación de la plaga en una proporción de 10 moscas estériles por cada silvestre o su dispersión preventiva en áreas erradicadas. Con esto se pretende que en el campo se produzca el apareamiento de los machos esterilizados en laboratorio con hembras silvestres, nativas de la región. De esta forma se interrumpe el ciclo de vida y progresivamente se reduce la población (Jasiorowski, 1993).

La técnica goza de total selectividad; es decir, que los insectos estériles liberados copulan solo con los de su misma especie, no alterando el equilibrio biológico del agroecosistema, dirigiéndose sólo hacia la plaga que se desea controlar y no se desarrollan resistencias (Jasiorowski, 1993).

9.4. Programa de Erradicación del Gusano Barrenador del Ganado -GBG –

En 1933 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos determinó que la mosca del gusano barrenador del ganado *C. hominivorax* era distinta a la especie *C. macellaria*, la cual en 1858 Coquerel, médico francés, la descubrió en lo senos frontales de un convicto que finalmente murió. Desde entonces se han registrado muchos casos en humano (Romero, 2003).

En 1936 se llevó a cabo la producción masiva bajo condiciones artificiales por Melvin y Bushland. En la erradicación fue decisivo también el uso de la técnica de los insectos estériles propuesta por Knippling en 1937. La técnica del insecto estéril ha sido su primera y más ambiciosa aplicación en todo el mundo hasta el momento. En 1972 se estableció la Comisión México- Americana para la erradicación del gusano barrenador del ganado y ha continuando a partir de ese momento a extendiéndose por toda Centro América. La erradicación del gusano barrenador en los Estados Unidos de América y en México se ha conseguido con un costo superior a los 500 millones de dólares EE.UU (Bram, 1985; FAO, 1992; Elizalde, 2005; Vargas- Terán, *et al*, 2005).

En respuesta a la emergencia sanitaria acontecida por esta plaga, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) designó y realizó con éxito un programa de erradicación basado en la técnica del insecto estéril (TIE). Una de las primeras acciones de la FAO fue recomendar que la miasis ocasionada por el gusano barrenador del ganado se incluyera en la lista internacional de enfermedades de

los animales de notificación obligatoria (Lista B). La recomendación fue aprobada por la sesión general en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en París, el 12 de mayo de 1989. Esto significó que la enfermedad se incluiría en los sistemas de reporte internacional y los datos de ocurrencia se publicarían en el Libro Anual de Salud Animal de la FAO/WHO/OIE. Asimismo, que las recomendaciones especiales para la importación y exportación de animales se incluyeran en el Código Zoosanitario Internacional de la OIE (FAO, 2005a).

10. ANALISIS MOLECULARES

10.1 El ADN Mitocondrial de los Insectos

Los genes de los artrópodos están formados por el DNA localizado en los cromosomas y consisten en proteínas, RNA y DNA. El DNA es un polímetro de nucleótidos. Cada nucleótido consiste de un azúcar pentosómico, una de las cuatro bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina, citosina) y un grupo fosfato (Hoy, 2003).

El DNA en los insectos presenta una estructura compleja, por lo que las diferentes especies de los insectos tienen un número diferente de cromosomas haploides, constituidos en un rango de 1 a 221. El porcentaje de bases nitrogenadas es menor en los insectos que en los vertebrados. Por ejemplo, guanina + citosina (G+C) presentan un 32% - 43% del ADN, comparado con los vertebrados que presentan el 45% (Hoy, 2003).

El ADN mitocondrial es el material genético ubicado en las mitocondrias y generan energía para la célula. Este no se recombina, así que los únicos cambios que puedan presentarse se deben a mutaciones a lo largo de múltiples generaciones, es decir, durante el tiempo evolutivo. El rango del tamaño del genoma mitocondrial se encuentra de 6 kb a más de 2 Mb. En el ADN mitocondrial (mtADN) se da la fosforilación oxidativa que da como resultado la formación de trifosfato de adenosina (ATP), que es la molécula primaria de almacenamiento de energía química en la célula. El mtADN es un componente significativo de el total del ADN en las células de los insectos y es transmitido por la madre a la progeie (Hoy, 2003).

10.2 El ADN Mitocondrial de *Cochliomyia hominivorax*

Los aspectos que favorecen el uso del mtADN como un marcador evolutivo son: el predominio de la línea materna, la falta de una extensiva recombinación y la rápida proporción de sustitución de nucleótidos.

El genoma mitocondrial de *C. hominivorax*, según Lessinger *et al.* (2000) es una molécula circular de 16022 pb. Al analizar el contenido del gen y la organización en general corresponde a una típica Brachycera. En el genoma de *C. hominivorax* se encontró un gen que usualmente contiene 13 proteínas codificables, 22 genes tRNA y 2 genes rRNA. La principal región no codificable, identificada como la Región Control del mtADN, está localizada entre el tRNA y rRNA y los genes 12S con un tamaño de 1175 pb. Además, la Región Control posee un alto contenido de A+T (77%) al igual

carbohidratos son removidos al emulsificar la mezcla buffer y tejido con fenoles o cloroformo (Gallego, 2002).

b. Reacción en Cadena de la Polimerasa –PCR-

El PCR es una metodología *in vitro* utilizada para sintetizar enzimáticamente secuencias definidas de ADN. Este método fue inventado por Kary Mullis en 1983. La reacción en cadena de la polimerasa permite la amplificación masiva de las secuencias de ADN específicas, siendo una herramienta importante en la biología molecular. Esta tiene su fundamento en la aneión de dos cebadores cortos. Cada uno de ellos son complementarios en la secuencia del ADN flanqueante de la región a ser amplificada (Gaitán y Gallego, 2002). La reacción usa una plantilla de ADN, dos oligonucleótidos cebadores que hibridizan a la cadena opuesta del ADN y la enzima Taq ADN polimerasa, que cataliza la elongación de los "cebadores. La mezcla de los cebadores, ADN, dNTPs (denucleótidos trifosatos), MgCl₂ y Taq es calentada para separar las cadenas del ADN que tienen la secuencia de interés (Cox y Sinclair, 1998; Gaitán y Gallego, 2002).

c. Electroforesis

Se conoce como electroforesis al transporte de partículas a través de un disolvente mediante un campo eléctrico. Esta técnica fue desarrollada inicialmente por Arne Tiselius en 1930 para la separación de proteínas séricas (Bernal, 2002). La mayoría de los polímeros biológicos poseen cargas eléctricas, siendo capaces de migrar bajo la

influencia de un campo eléctrico. Esta es una técnica muy utilizada en la separación de ácidos nucleicos. En la electroforesis de ácidos nucleicos, el efecto de tamiz molecular del gel también es el principal factor de la separación, puesto que la relación carga- masa es la misma para todos los polinucleótidos. Las moléculas de menor tamaño avanzan más rápidamente a través del gel que las de mayor tamaño (Freifelder, 1991).

d. Secuenciación

La secuenciación de nucleótidos en el ADN es la portadora de la información genética que codifica por proteínas y RNA. En los años 70 se generaron dos métodos para realizar este procedimiento. El primero es el método de Maxam y Gilbert (Degradación química), que consiste en la utilización de reactivos químicos que modifican especialmente las purinas y pirimidinas presentes en el ADN, realizando cuatro reacciones. La cadena se rompe de un modo selectivo en cada una de las posiciones ocupadas por las cuatro bases modificadas. El segundo método es el de Sanger en Inglaterra (enzimático), el cual se fundamenta sobre dos propiedades del ADN polimerasa, es decir, su habilidad para sintetizar una copia complementaria de una plantilla de ADN y de utilizar 2'3'-dideoxynucleósidos trifosfatos como sustratos. Este método consiste en la síntesis de una cadena complementaria al ADN que se pretende secuenciar. En un ADN de cadena sencilla se aparean un oligonucleótido cebadores complementario que actúa como cebador (Gaitán, 2002). Según Hoelzel (1992), la secuenciación es un método óptimo para la comparación de poblaciones debido a su alta resolución y facilidad de interpretación.

e. Secuenciación en Ciclo

Este procedimiento consiste en una amplificación lineal de la reacción de secuencia, usando 25 ciclos de desnaturalización y alineamiento de un cebador específico a una cadena y la extensión en presencia de Taq DNA polimerasa más dideoxinucleótidos marcados (Fluorescencia). Una de las principales ventajas de esta técnica es reducir la cantidad de ADN necesaria para la secuenciación, debido a que se produce una cantidad suficiente después de 25 ciclos de amplificación (Gaitán, 2002).

Según Gaitán (2002) se han determinado las siguientes aplicaciones de la secuenciación en ciclo:

- Evolución de genes, incluyendo estudios del proceso que produce la variación a nivel de secuencias, estudios del origen de alelos nuevos o loci nuevos e investigaciones de convergencia y selección.
- Estudios de poblaciones o intraespecíficos incluyendo estudios de variación geográfica, flujo de genes, hibridación y conservación genética.
- Estudios interespecíficos tales como la construcción de filogenias de especies para evaluar la macroevolución de patrones y procesos.

15. ESTUDIOS GENÉTICOS REALIZADOS A *C. hominivorax* y *C. macellaria*

15.1. Estudios para *C. hominivorax*

Lessinger *et al.* (2000) determinaron la secuencia del genoma mitocondrial del gusano barrenador del ganado, obteniendo una secuencia de 16,022 pb (pares de bases), indicando que este tamaño es típico de un genoma mitocondrial del suborden Brachycera.

También se han realizado varios estudios genéticos poblacionales en el gusano barrenador del ganado en varias regiones de América. Por ejemplo, Roehrdanz (1989) realizó estudios de la variabilidad genética intraespecífica del mtDNA de 30 cepas de *C. hominivorax*, desde Texas hasta Costa Rica utilizando 15 enzimas de restricción, demostrando que estas poblaciones presentan variación genética. Azeredo-Spin, (1993) realizó estudios para 12 poblaciones de Brasil procedentes de 7 localidades encontrando alta variabilidad en el genoma mtADN. De igual forma, estudios de análisis citogenéticos y morfológicos han sido desarrollados en algunas poblaciones del gusano barrenador del ganado en Norte América y Brasil (Vargas y Lima, 1995). Narang y Degrugillier (1995) realizaron estudios con el gusano barrenador del ganado con poblaciones de Libia y las comparó con las de Norte y Centro América, Jamaica y Sur América, utilizando 8 enzimas de restricción. También Jaramillo y Villada (1999), trabajaron en 6 poblaciones panameñas del gusano barrenador del ganado secuenciando el gen Citocromo oxidasa I, encontrando que las secuencias no presentaron diferencias significativas concluyendo que en Panamá existe panmixia entre las poblaciones estudiadas. Lyra *et al.* (2005) realizaron estudios en siete poblaciones del gusano barrenador del ganado y de *C. macellaria* en distintas zonas geográficas ganaderas de mayor importancia de Uruguay, observándose nueve haplotipos, demostrando una alta variabilidad en el mtADN de las poblaciones evaluadas. Sin embargo, al aplicar el índice de similaridad, indicó que no hay evidencia de diferenciación en las subpoblaciones, concluyendo que la población de *C. hominivorax* de Uruguay es una única población en equilibrio. Posteriormente, Maliphan, *et al.* (2006) realizó estudios en

poblaciones criadas en el laboratorio de Bioseguridad USDA-ARS de Lincoln, Nebraska, utilizando 30 enzimas de restricción encontrando 16 sitios de restricción.

15.2. Estudios para *C. macellaria*

Lessinger y Azerdo-Espin (2000) dirigieron sus estudios en varias especies de moscas causantes de miasis (*Cochliomyia hominivorax*, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala*, *Luculia eximia* y *Dermatobia hominis*) en la región de Control del ADN mitocondrial, encontrando una variación en la longitud entre especies comprendidas entre 1,000 pb a 1,600 pb. Litjens, *et al.* (2001) también realizaron estudios en la caracterización molecular de *C. hominivorax* e incluyeron a la especie *C. macellaria*. Ellos amplificaron dos regiones específicas, Citocromo Oxidasa subunidad I con 870 pb y la Región Control hasta el gen 12S rRNA con 2,100 pb en siete poblaciones de Brasil.

Con respecto a *C. macellaria* con técnicas como RAPD-PCR, RFLP-PCR, etc. están el de Skoda, *et al.* (2002) quienes realizaron estudios comparativos con *C. hominivorax* y *C. macellaria* utilizando la técnica random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction (RAPD-PCR) evaluando 120 “primers” elegidos al azar, de los cuales encontraron 21 “primers” que producen marcadores. Posteriormente fueron estudiados estos 21 “primers”, en dónde encontraron que siete de estos producen claros y reproducibles marcadores que fueron evaluados en cuatro poblaciones del gusano barrenador del ganado y *C. macellaria*.

16. CARACTERISTICAS ECOLOGICAS DE LOS LUGARES DE ORIGEN DE LAS CEPAS DE *C. hominivorax*

16.1 OAXACA, MEXICO

Oaxaca esta ubicada al norte 18°39', al sur 15°39' de latitud norte; al este 93°52', al oeste 98°32' de longitud oeste. En esta región predomina el clima tropical. Su temperatura media anual es de 18°C. Sin embargo, presenta una geografía provocando variaciones del clima, en los litorales prevalece una temperatura promedio de 27°C, mientras que en el valle es de 22° C con clima templado subhúmedo. En cuanto a la altitud, la mínima está al nivel de mar, presentando un clima cálido, y la máxima se encuentra en la Sierra Madre del sur con 3,750 msnm en donde el clima es templado con inviernos fríos. En Oaxaca se encuentran todos los ecosistemas, desde selvas húmedas y bosques tropicales hasta selvas secas, bosques espinosos y zonas desérticas. La precipitación promedio anual se presenta desde los 509 mm hasta los 3795 mm, dependiendo de la región (INEGI, 1998; INEGI, 1999; INEGI, 2000; SEP, 1997)

16.2 QUINTANA ROO, MEXICO

Geográficamente Quintan Roo está ubicada al norte 21°37', al sur 17°53' de latitud norte; al este 86°42', al oeste 89°20' de longitud oeste. El relieve es escaso, presentando su altitud máxima a 230 msnm. En este estado predomina el clima tropical con lluvias en verano, excepto en el suroeste y el sureste, donde predomina una temperatura tropical con intensas lluvias periódicas e invierno seco en el norte. Al oeste también es tropical, pero con lluvias intensas en verano. Al norte, el clima es de sabana con lluvias periódicas e invierno seco. La temperatura media anual es de 26 °C. Su

precipitación promedio anual fluctúa entre 1061 mm a 1393mm. La época seca es de febrero a mayo y la lluviosa de mayo a octubre, aunque con frecuencia se prolonga hasta enero en forma de chubascos procedentes del norte. La flora varía de acuerdo con el clima, entre selva baja a alta (Campillo, 1988; INEGI, 1998).

16.3 CHIAPAS, MEXICO

Chiapas está ubicada al norte 17°59', al sur 14°32' de latitud norte; al este 90°22', al oeste 94°14' de longitud oeste. Su territorio está conformado con zona de montaña y de planicie. En la sierra de Chiapas existen grandes extensiones de terreno pobladas por bosques y selvas con plantas y animales de clima templado húmedo. La parte baja de Chiapas está compuesta de bosques caducifolios y praderas y la zona costera de manglares. En general, su clima es tropical húmedo y sub-húmedo, debido a que este cambia dependiendo de la altura del lugar. En Los Altos es templado húmedo y con muchas lluvias en verano. En las localidades de lugares bajos, como Tapachula, tienen clima cálido con una temperatura media anual de 27.8 °C. En Chiapas llueve en los meses más calurosos y las lluvias disminuyen en los meses fríos. Su precipitación promedio es muy variable, dependiendo de la localidad, siendo entre 3,977.5 mm para la zona más lluviosa (Pichucalco) a 1,105.5 mm en San Cristobal de las Casas (Gordillo y Ortíz, 1977; SEP, 1997; INEGI, 2000).

16.4 OESTE DE SAN JOSE, COSTA RICA

Las colectas de la cepa de Costa Rica se llevó a cabo en el oeste de San José, donde se encuentra el territorio de San Ramón de Tres Ríos y Coronado presentando una latitud de 9° 53'13.70" Norte y una longitud 83° 59' 4.95" Este. Esta región se caracteriza por tener una altitud de 1500 msnm. Pertenece a la zona de vida Bosque Pluvial Montano Bajo. Su precipitación media anual de 1834.5 mm con una temperatura promedio anual de 19.1 °C. Esta región posee suelos volcánicos con pendientes de 15% a 60%, topografía bastante accidentada. La época lluviosa está comprendida ente mayo a noviembre y la época seca de diciembre a abril (Herrera y Gómez, 1985; Gómez y Herrera, 1986; Anónimo 1988; Herrera y Gómez, 1993).

16.5 NORTE DE LA CIUDAD DE PANAMA, PANAMA

La ciudad de Panamá está ubicada a los 9 00' 53" de latitud Norte y 79 31' 02" de longitud Oeste. Su altitud oscila entre 0 y 125 msnm. Presenta clima tropical con una temperatura promedio de 27.7°C y humedad relativa promedio anual 70%. El clima en el entorno del distrito y en el área de la ciudad es lluvioso durante los meses de mayo a diciembre y cuenta con una temporada seca de enero a abril. El viento norte veraniego mantiene el clima fresco constantemente. Esta región presenta una precipitación media diaria de 5.1 mm y una humedad relativa media anual de 75%. La temperatura a lo largo del año oscila entre 25° C y 35° C, dependiendo del mes. La precipitación anual promedio es de 1900 mm (Diccionario Geográfico de Panamá, 2001; Hidromet, 2006).

17. DESCRIPCION DE LA CRIANZA DE LAS CEPAS

Cada una de las cepas del gusano barrenador del ganado fueron criadas en laboratorio como poblaciones aisladas. El laboratorio actualmente se encuentra en la planta productora de moscas estériles ubicada en Pacora, Panamá. Estas instalaciones cumplen con las características de un laboratorio de bio-seguridad de nivel 2 (BSL2), siendo apropiado para trabajar fluidos corporales y tejidos que presentan un agente de infección que podría ser desconocido. Si el laboratorio es usado correctamente funciona como una barrera primaria. Su uso correcto implica el empleo de mascarillas protectoras, guantes, batas o uniforme especial para el laboratorio. El personal y visitantes deben bañarse antes y después de acceder a él. Las instalaciones del laboratorio cuentan con las siguientes áreas relacionadas con la cría de las moscas:

- Cuarto de preparación de la dieta para las larvas. Lugar donde se tiene los ingredientes y equipo para preparar las dietas.
- Cuarto de crecimiento larvario, apareamiento y oviposición. Lugar que posee bandejas plásticas que contienen las dietas.
- Cuarto de eclosión: en este cuarto las pupas han sido colocadas en pequeños vasos de plástico dentro de una jaula para esperar que las pupas eclosionen.
- Un cuarto caliente para guardar equipo de trabajo (esterilización).



Figura 2. a. Jaulas de reproducción de las moscas, Laboratorio ARS-USDA, Pacora Panamá. .
b. Bandejas con pupas, Laboratorio de ARS-USDA, Pacora, Panamá.

18. CARACTERÍSTICAS DE ÁREA DE COLECTA DE *C. macellaria*

La colecta fue realizada en el corregimiento de Pacora, el cual se encuentra dentro del perímetro de la ciudad de Panamá, a una latitud de 9 04' 59" norte y una longitud de 79 17' 27" oeste. Presenta una altitud entre 20 a 199 msnm. Su temperatura promedio en los meses de colecta (15 de marzo – 15 mayo) es de 27.4 °C y precipitación promedio anual 1300 mm. Se ubica en la zona de vida según Holdridge de Bosque húmedo tropical, aunque parte de ese bosque ha sido deforestado por el crecimiento urbano (Diccionario Geográfico de Panamá, 2001; Hidromet, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron especímenes de 6 cepas del gusano barrenador del ganado *Cochliomyia hominivorax* y la especie *Cochliomyia macellaria*. Las cepas, fueron colectadas en México, Costa Rica y Panamá, en las localidades descritas en el cuadro 2 y figura 4. Posteriormente se levantó un pie de cría, donde hasta la fecha se mantienen en laboratorio como poblaciones aisladas en jaulas. El cuadro 3 muestra las principales características morfológicas que diferencian a cada cepa del gusano barrenador en este estudio.

Cuadro 2. Latitud, Longitud y año de colecta de las cepas de *C. hominivorax* y la especie *C. macellaria*.

Especie	Cepa	Lugar de Procedencia	Latitud	Longitud	Año
<i>C. hominivorax</i>	LH	Oaxaca, México	17.05	-96.7167	1983
<i>C. hominivorax</i>	P-95	Norte de la ciudad de Panamá, Panamá	9.3333	-82.25	1995
<i>C. hominivorax</i>	CECH	Quintana Roo, México	19.6667	-88.5	1983
<i>C. hominivorax</i>	PA-34	Chiapas, México	16.5	-92.5	1983
<i>C. hominivorax</i>	CR-92	Oeste de San José, Costa Rica	10	-84.25	1992
<i>C. hominivorax</i>	Limón	Chiapas, México	16.5	-92.5	1993
<i>C. macellaria</i>		Pacora, Panamá	8.41667	-81.67	2006

Cuadro 3. Principales características de las cepas de *C. hominivorax*.

Especie	Cepa	Principales características
<i>C. hominivorax</i>	LH	ojos amarillos
<i>C. hominivorax</i>	CECH	ojos rojos
<i>C. hominivorax</i>	LIMON	ojos verde claro
<i>C. hominivorax</i>	PA-34	ojos anaranjados
<i>C. hominivorax</i>	P-95	tipo salvaje
<i>C. hominivorax</i>	CR-92	tipo salvaje



Figura 3. Localización geográfica del origen de las cepas evaluadas.

2. COLECTA DE *C. macellaria*

Durante dos meses (15 marzo – 15 mayo de 2006) se realizó la colecta en el campo, iniciando la actividad con la selección del sitio adecuado. Estas actividades se realizaron en los campos de Pacora, Panamá. Para esto se utilizó como atrayente hígado de pollo, que fueron colocados en un recipiente plástico con tapadera y dejado en un cuarto a temperatura ambiente durante 3 días previos al inicio de la colecta para que se iniciara el proceso de descomposición y sirviera como atrayente de las moscas. Se colocó el hígado en una bandeja de plástico a un lado del cerco de los potreros, se capturaron las moscas con la ayuda de una red entomológica. Estas se identificaron y se colocaron en viales. Para la identificación de la mosca en el campo se usaron los criterios que aparecen en el cuadro 4.

Cuadro. 4. Principales características para diferenciar a los adultos de *C. hominivorax* de *C. macellaria* en el campo (Álvarez, 1996).

Características	<i>C. hominivorax</i>	<i>C. macellaria</i>
Cabeza	Vista dorsal: punto rojo entre los ojos en las hembras. Vista frontal: con pelos frontales entrecruzados.	Vista dorsal: sin punto rojo en hembras y machos. Vista frontal: con pelos frontales NO entrecruzados
Tórax	Vista dorsal: con 3 líneas oscuras (las dos externas de iguales y la interna más corta).	Vista dorsal: con 3 líneas oscuras (las tres del mismo tamaño).
Ala: Basicosta	Pigmento café oscuro	Pigmento café claro
ABDOMEN	Vista ventral: pubescencia blanca poco notoria.	Vista ventral: pubescencia blanca muy notoria.

Los viales que contenían las moscas vivas se llevaron al laboratorio, donde se colocaron en un congelador con una temperatura de -26°C para que murieran congeladas.

Luego de un periodo de 4 horas de permanecer en el congelador se sacaron del mismo y se le aplicó a cada vial alcohol al 95%. De esta forma, las moscas estaban listas para ser llevadas al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Smithsonian en Naos, Panamá.

3. EXTRACCIÓN DEL mtADN

El ADN se extrajo utilizando CTAB (bromuro de 6,10,3 metilamonio) como extracción inicial. El tórax de cada mosca de las cepas en estudio se maceró en la solución de 2X CTAB (500 μ l) y se le agregó 10 μ l de proteinasa K (20 μ g/ μ l), luego se incubó a 55 °C por toda la noche. Posteriormente, la mezcla se lavó con 500 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (PCI) y mezcló por 5 minutos. Luego se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y limpio. Posteriormente, la mezcla se lavó nuevamente con 500 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (PCI) y mezcló por 5 minutos. Después esta se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante de estas muestras se extrajo con 500 μ l de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló a mano por 5 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, el sobrenadante de esta mezcla se extrajo con 500 μ l de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló a mano por 5 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos. Finalmente el sobrenadante de esta última mezcla se agregó 1000 μ l de etanol al 100% y dejó precipitar el ADN toda la noche a -20°C. Luego de la precipitación, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 45 minutos a 4 °C para formar un pellet con el ADN en el fondo del tubo, al cual se le decantó el etanol. Posteriormente se agregó 1000 μ l de etanol 70% a -20°C para lavar el

pellet de ADN y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos, este etanol se decantó y se con la máquina “Speed Vac” o en la incubadora a 55°C. Finalmente, a esta muestra se le agregó 100 µl de buffer TE para resuspender el ADN. Al ADN extraído se verificó la calidad mediante electroforesis en agarosa.

4. AMPLIFICACIÓN DE PCR

Los cebadores rediseñados fueron apareados y utilizados en la amplificación del mt ADN. La reacción de PCR que se estableció para iniciar la investigación fue la propuesta por Maliphan *et al.* (2006). Las reacciones de PCR fueron conducidas en una mezcla de PCR de 25µl conteniendo 2 µg del stock de ADN extraído anteriormente; 2.5 µl de la solución buffer II 10X PCR; 0.25 µl de Qiagen Taq DNA polimerasa; 2 µl de 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP; 0.2 µM de cada cebador; 2.5 µl de 2.5 mM de MgCl₂ y agua doblemente destilada para completar el volumen. La mezcla de PCR se colocó en el termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler.

La reacción que fue desarrollada en el termociclador empleó como base una desnaturalización inicial del DNA a 94°C por tres minutos. Posteriormente, 94°C por un minuto. Después se dio el reconocimiento de cada cebador de la cadena de DNA a una temperatura entre 50°C – 60°C por 30 segundos (más adelante se especifica para cada cebador). Luego se pasó a la etapa de alargamiento de la nueva hélice de DNA a 72°C por un minuto. Después de 35 termociclos, se hizo un alargamiento final a 72°C por dos minutos. Algunos de estos pasos fueron optimizados para lograr la amplificación,

procedimiento que se detalla mas adelante. Finalmente, una muestra de los productos amplificados fue visualizada en electroforesis de gel de agarosa. El residuo de la muestra fue almacenado a 4°C para futuros análisis. Los cebadores que fueron evaluados y sus regiones de amplificación son descritas en el cuadro 5.

Cuadro No. 5 Cebadores utilizados en la investigación (Maliphan *et al.* 2006).

CÓDIGO	NOMBRE	SECUENCIAS	TAMAÑO (pb)
3F 3R	N2-J-1480 C2-N-3793	TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC GAGACCATTACTTGCTTTTCAGTCATCT	2450
4F 4R	C2-J-3662 N3-N-5942	GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG TGATTTTCATTCATGATATAAGTCC	2320
7F 7R	N5-J-7660 N5-N-8853	TTCTGATCATCCCTGATC GTAAAATCTTATAATGCTGG	1194
8F 8R	N5-J-8621 N4-N-9676	GCTATAGCAGCTGGCAATCAAG CTTATGAACGGATGGGGAGTC	1076
9F 9R	N4-J-9580 NL-N-10740	TAGGAGGAGCAGCCATATTTGGC GAAGGTCTTGGGCTTTCT	1161
10F 10R	NL-J-1075 CB-N-11872	AAGCCCAAGACCTTC GATGCACCATTGGCATGT	1148

5. EVALUACIONES PARA CADA CEBADOR

5.1 CEBADOR 3

Primero se usó como base el protocolo de Maliphan *et al.* (2006), al cual se le hicieron las siguientes modificaciones: 2.5 µl de la solución 1X buffer, 0.75 µl de 25 mM de MgCl₂, 2 µl de 0.1 mM de dNTPs, 0.5 µl de 0.2 mM de cada cebador, 0.25 µl de 0.025 U/µl de Taq, 2µl de la extracción del ADN. A partir de este protocolo fueron variando las concentraciones hasta optimizar el protocolo como se describe a continuación. Las concentraciones del cebador evaluadas para este análisis fueron de 0.2

mM y 0.5 mM. Para este cebador también se evaluaron dos concentraciones de ADN, el ADN concentrado de la extracción original y diluido en una relación 1:10. Para el MgCl₂ se evaluaron las concentraciones de 0.75mM, 1.0mM, 1.25mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM. Con respecto a dNTPs, además de 0.1 mM, se evaluaron las concentraciones de 0.15mM y 0.2mM. Adicionalmente, se evaluaron diversas enzimas Taq procedentes de distintas casas comerciales: Amplitaq, Qiagen Taq y TaqGold. En el buffer también se evaluó una concentración adicional a 0.73X.

Se realizó la prueba de gradientes de temperatura utilizando un rango de 48°C – 60°C. Para este cebador también se evaluaron algunos cambios en el programa para correr la PCR en el alargamiento de la nueva hélice de ADN a 72°C por dos minutos y luego de los 35 termociclos un alargamiento final por 10 minutos.

El protocolo siguiente fue el mejor para obtener amplificaciones:

Taq buffer	0.73X
MgCl ₂	2.0 mM
dNTPs	0.15 mM
Primer	0.5 mM
QiagenTaq	1U/μl

Sin embargo estas fueron inconsistentes entre las cepas de *C. hominivorax*, por lo que se recomienda a partir del mismo iniciar nuevos estudios. El programa de PCR quedó definido como: paso inicial de 94°C por un minuto, extensión de 94°C por un minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por dos minutos, 34 termociclos, 72°C por 10 minutos.

5.2 CEBADOR 4

En este cebador, además del protocolo inicial descrito en el cebador 3, se evaluaron las de 0.2 mM y 0.5 mM de cada cebador. Para este no fue necesario evaluar las dos concentraciones del ADN, empleándose únicamente el ADN concentrado de la extracción original. Para el MgCl₂ se evaluaron las concentraciones de 0.75mM, 1.0mM, 1.25mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM. Para la concentración de dNTP's además de 0.1 mM se evaluaron las concentraciones de 0.15mM y 0.2mM. Además, fueron evaluados diversas enzimas Taq procedentes de distintas casas comerciales: Amplitaq, Qiagen Taq, TaqGold. En el buffer, también se evaluó una concentración a 0.73X. Se realizó la prueba de gradientes de temperatura utilizando un rango de 48°C – 60°C. A este cebador, al igual que el cebador 3, también fue necesario realizar algunas evaluaciones en el programa para correr el PCR. Los cambios evaluados fueron en el alargamiento de la nueva hélice de ADN a 72°C por dos minutos y luego de los 35 termociclos un alargamiento final por 10 minutos.

Luego de todas estas evaluaciones se logró amplificar con el siguiente protocolo:

Taq buffer	1X
MgCl ₂	2.0 mM
dNTPs	0.15 mM
Primer	0.5 mM
QiagenTaq	1U/μl

Sin embargo, la amplificación no fue consistente para todas las cepas, por lo que al igual que el cebador 3, se recomienda a partir del anterior protocolo iniciar las futuras evaluaciones. El programa de PCR que quedó finalmente para este cebador fue:

temperatura inicial 94°C por un minuto, temperatura de extensión 94°C por un minuto, 51°C por 30 segundos, 72°C por dos minutos, 34 termociclos, 72°C por 10 minutos.

5.3 CEBADOR 7

Para este cebador se realizó inicialmente el protocolo de Maliphan *et al.* (2006) realizando las siguientes modificaciones: 2.5 µl de la solución 1X buffer, 0.75 µl de 25 mM de MgCl₂, 2 µl de 0.1 mM de dNTPs, 0.5 µl de 0.2 mM de cada cebador, 0.25 µl de 0.025 U/µl de Taq, 2µl de la extracción del ADN. La concentración del cebador evaluada para este fue 0.5 mM. Se empleó el ADN concentrado de la extracción original. Para el MgCl₂ se evaluaron las concentraciones de 0.75mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM. Para la concentración de dNTPs, además de 0.1 mM, se evaluó la concentración de 0.2mM. A este cebador no fue necesario realizar la prueba de gradientes de temperatura, debido a que se utilizó la recomendada por Maliphan *et al.* (2006) a 52°C y funcionó perfectamente.

El protocolo quedó optimizado de la siguiente forma:

Taq buffer	1X
MgCl ₂	2.0 mM
DNTPs	0.2 mM
Primer	0.5 mM
QiagenTaq	1U/µl

El programa de PCR quedó definido con los siguientes pasos: temperatura inicial de 94 °C por 3 minuto, una temperatura de extensión de 94 °C por un minuto, 52°C por 30 segundos, 72°C por un minutos, 34 termociclos , 72°C por 2 minutos.

5.4 CEBADOR 8

Al igual que los cebadores anteriores se utilizó el protocolo de Maliphan *et al.* (2006), con las mismas modificaciones: 2.5 µl de la solución 1X buffer, 0.75 µl de 25 mM de MgCl₂, 2 µl de 0.1 mM de dNTPs, 0.5 µl de 0.2 mM de cada cebador, 0.25 µl de 0.025 U/µl de Taq, 2µl de la extracción del ADN. La concentración de cebador evaluada para este fue 0.5 mM. Para este cebador tampoco fue necesario evaluar dos concentraciones del ADN, empleándose únicamente el ADN concentrado de la extracción original. Para el MgCl₂ se evaluaron las concentraciones de 0.75mM, 1.25mM, 1.5 mM y 2.5mM Para la concentración de dNTPs además de 0.1 mM se evaluó la concentración de 0.2mM. Se realizó la prueba de gradientes de temperatura utilizando un rango de 54°C – 60°C. El protocolo final para este cebador quedó optimizado de la siguiente forma:

Taq buffer	1X
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
Primer	0.5 mM
QiagenTaq	1U/µl

y el programa de PCR quedó definido con los siguientes pasos: temperatura inicial 94°C por 3 minuto, temperatura de extensión 94°C por un minuto, 60°C por 30 segundos, 72°C por un minutos, 34 termociclos, 72°C por 2 minutos.

5.5 CEBADOR 9

Se utilizó el protocolo de Maliphan *et al.* (2006) con las siguientes modificaciones: 2.5 µl de la solución 1X buffer, 0.75 µl de 25 mM de MgCl₂, 2 µl de 0.1 mM de dNTPs, 0.5 µl de 0.2 mM de cada cebador, 0.25 µl de 0.025 U/µl de Taq, 2µl

de la extracción del ADN. La concentración de cebador evaluada para este fue 0.5 mM. Se empleó únicamente el ADN concentrado de la extracción original. Con respecto al MgCl₂ se evaluaron las concentraciones de 0.75mM, 1.5 mM, 2.5mM, 3.0mM, 3.5mM y 4mM Para la concentración de dNTPs además de 0.1 mM se evaluó la concentración de 0.2mM. No fue necesario realizar la prueba de gradientes de temperatura, debido a que la temperatura propuesta por Maliphan *et al.* (2006) funcionó muy bien. El protocolo final quedó optimizado de la siguiente forma:

Taq buffer	1X
MgCl ₂	3.0 mM
dNTPs	0.2 mM
Primer	0.5 mM
QuigenTaq	1U/μl

y el programa de PCR quedó definido con los siguientes pasos: temperatura inicial de 94°C por 3 minuto, temperatura de extensión de 94°C por un minuto, 57°C por 30 segundos, 72°C por un minutos, 34 termociclos, 72°C por 2 minutos.

5.6 CEBADOR 10

Se utilizó inicialmente el protocolo de Maliphan *et al.* (2006), con algunas modificaciones: 2.5 μl de la solución 1X buffer, 0.75 μl de 25 mM de MgCl₂, 2 μl de 0.1 mM de dNTPs, 0.5 μl de 0.2 mM de cada cebador, 0.25 μl de 0.025 U/μl de Taq, 2μl de la extracción del ADN. Se utilizó 0.5 mM de cada cebador. Se empleó el ADN concentrado de la extracción original. Con respecto al MgCl₂, se evaluaron las concentraciones de 0.75mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM y 4mM, también se realizó la prueba de gradientes de temperatura utilizando un rango de 50°C – 60°C.

El cebador 10 no se logró optimizar, fue inconsistente al amplificar todas las cepas en estudio, sin embargo el protocolo que amplificó para algunas cepas fue:

Taq buffer	1X
MgCl ₂	2.0 mM
dNTPs	0.2 mM
Primer	0.5 mM
QuigenTaq	1U/ μ l

y el programa de PCR que se utilizó para este protocolo fue: temperatura inicial 94°C por un minuto, temperatura de extensión 94°C por un minuto, 59°C por 30 segundos, 72°C por dos minutos, 34 termociclos, 72°C por 10 minutos.

6. PCR PARA CADA CEBADOR

Luego de establecido el protocolo óptimo para cada cebador se realizó el PCR, utilizando el ADN extraído de dos individuos de cada cepa de *C. hominivorax* y de *C. macellaria*.

7. VISUALIZACIÓN DE PCR

Para la visualización del producto del PCR se corrió la electroforesis con gel de agarosa a una concentración de 1.5 a 98v. por aproximadamente 45 minutos. Luego se visualizó con luz ultravioleta y se fotografió el gel.

8. PREPARACIÓN PARA CORTAR BANDAS

El producto de la PCR se colocó en un gel de "Low Melting temperature agarose" a una concentración de 2.0%. La cámara de electroforesis se cargó con el producto del PCR. Esta se dejó correr a 98v. aproximadamente por 45 minutos. Luego se visualizó con luz ultravioleta y se fotografió el gel. Posteriormente, el gel se llevó a una mesa con luz ultravioleta Foto/Prep I by Fotodyne para cortar las bandas de cada individuo amplificado. Cada una de estas se colocó en un tubo que se llevaron a la máquina termocicladora Perkin Elmer Cetus DNA Thermo Cycler 480 en donde permanecieron por 5 minutos a 70°C. Luego, se colocaron a 45°C, dejándolos por 15 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se les agregó a cada tubo 1.2 µl de gelasa y se dejaron en la máquina a 45°C.

9. SECUENCIACIÓN EN CICLO (CYCLE SEQUENCING)

La secuenciación en ciclo se realizó utilizando el siguiente protocolo: 2µl de agua doble destilada, 3µl de buffer BD 5X, 1µl del cebador "F"/"R", 1 µl de big dye y 3µl de la banda cortada y tratada con gelasa. Luego la mezcla se centrifugó por 30 segundos. Después de centrifugada se llevaron al termociclador PTC-200 utilizando el programa CS3100, el cual consistió en una temperatura inicial de 96 °C por un minuto, luego 96 °C por 10 segundos, seguido de 50 °C por 5 segundos, luego a 60 °C por 4 minutos, y finalmente 24 ciclos desde el segundo paso. Al terminar este proceso, a los tubos se les agregó 10 µl de agua doblemente destilada.

10. COLUMNAS DE SEPHADEX

Las columnas se prepararon con Sephadex G-50. A cada columna se le agregó 780 μ l de Sephadex. Luego se colocaron en una centrifugadora a 400 rpm, por dos minutos. A cada columna se le agregó la reacción de secuenciación. Luego se colocaron en una centrifugadora a 3,600 rpm por 3 minutos. La reacción que quedó se llevó a la máquina Speed vac, se centrifugó por 30 minutos para secarlos. A los tubos secos se les agregó 10 μ l de diformamida y se corrieron las secuencias en una secuenciadora Applied Biosystem 3130xl Genetic Analyzer (Hitachi) con un lectura del fragmento del 98.5% de exactitud.

11. OPTIMIZACION DE PROTOCOLOS DE PCR PARA *Cochliomyia macellaria*

Para *C. macellaria*, se evaluaron únicamente los 3 cebadores que se lograron optimizar para *C. hominivorax*, los cuales son:

- a. cebador (7) F: N5-J-7660; R: N5-N-8853
- b. cebador (8) F: N5-J-8621; R: N4-N-9676
- c. cebador (9) F: N4-J-9580; R: NL-N-10740

11.1. CEBADOR 7

Varias pruebas se realizaron para optimizar este cebador, sin embargo, no se logró la amplificación. Todas estas pruebas efectuadas se describen en el anexo 1.

11.2. CEBADOR 8

Inicialmente se realizó el protocolo que había sido optimizado para *C. hominivorax*. A partir de este protocolo se varió las concentraciones hasta optimizarlo. Las siguientes concentraciones de MgCl₂ fueron evaluadas: 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM y

3mM. A cada una de ellas se les realizó una prueba de gradiente de temperatura de 50 °C a 60 °C. Finalmente quedó optimizado con el siguiente protocolo:

Taq buffer	1X
MgCl ₂	1.25 mM
dNTPs	0.2 mM
Primer	0.5 mM
QiagenTaq	1U/μl

El programa de PCR quedó definido con los siguientes pasos: temperatura inicial 94°C por un minuto, extensión 94°C por un minuto, 52°C por 30 segundos, 72°C por dos minutos, 34 termociclos, 72°C por 2 minutos.

11.3 CEBADOR 9

Inicialmente se realizó el protocolo para *C. hominivorax* que había sido optimizado. A partir de este protocolo se evaluaron las siguientes concentraciones de MgCl₂: 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM y 3mM. A cada una de ellas se les realizó una prueba de gradiente de temperatura de de 50 °C a 60 °C. El protocolo que quedó optimizado fue:

Taq buffer	1X
MgCl ₂	2.0 mM
dNTPs	0.2 mM
Primer	0.5 mM
QiagenTaq	1U/μl

El programa de PCR quedó definido con los siguientes pasos: temperatura inicial 94°C por un minuto, de extensión 94°C por un minuto, 52°C por 30 segundos, 72°C por dos minutos, 34 termociclos, 72°C por 2 minutos.

12. REGIONES AMPLIFICADAS

A partir de los protocolos definidos se hicieron las PCRs para cada una de las regiones que amplifica cada cebador. Posteriormente, se realizó la secuenciación en ciclo para obtener las secuencias de cada una de las regiones amplificadas para las dos especies en estudio: *C. hominivorax* y *C. macellaria*, lo que permitió obtener el genoma de las regiones NADH4 – NADH5 para *C. hominivorax* y NADH4 para *C. macellaria* más una pequeña región de NADH5 que se logró amplificar con el cebador 8.

13. ANALISIS FILOGENETICOS

Las secuencias obtenidas fueron comparadas y corregidas en el programa Sequencher 6.4. Luego fueron alineadas y se prepararon las matrices NEXUS en PAUP*4.0b10(Altivez). Cada una de las tres regiones secuenciadas fueron analizadas independientemente. Para cada una de las regiones se realizaron análisis utilizando los criterios de distancias (NJ) y de Parsimonia con el programa PAUP*4.0b10(Altivez). Para determinar si se podía realizar un análisis combinado de las tres regiones se realizó un análisis de Partición en el programa PAUP*4.0b10(Altivez). Además se realizó el análisis de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML). Luego se realizó el análisis en MrModeltest y posteriormente se realizó el análisis Bayesiano. El análisis de Parsimonia fue realizado utilizando heuristic searches con TBR Branch Swapping. Para conocer el grado de soporte de las ramas se utilizó el análisis de Bootstrap (1000 replicas). Para el análisis ML se utilizó Modeltest 3.6 para elegir el mejor modelo de

sustitución en los datos. Los modelos que se utilizaron para el análisis fueron HKY+1 y GTR+G. El análisis filogenético Bayesiano fue conducido utilizando MrBayes 3.1.

Todos los análisis mostraron árboles con similar topologías. Se eligió el árbol filogenético del análisis Bayesiano para presentarlo en los resultados de la investigación debido a que este proporciona al mismo tiempo un árbol filogenético con soporte, el cual según Harrison y Langdale (2006) es conceptualmente equivalente a Maximum Likelihood (ML) con Bootstrapping. Los árboles filogenéticos obtenidos de estos análisis fueron editados en el programa Canvas 9™.

RESULTADOS

1. OPTIMIZACION DE LOS CEBADORES PARA *C. hominivorax*

Cuadro 6. Protocolos optimizados de cada cebador evaluado.

	<i>C. hominivorax</i>			<i>C. macellaria</i>	
	Cebador 7	Cebador 8	Cebador 9	Cebador 8	Cebador 9
Buffer	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	2 mM	1.25 mM	3 mM	1.25mM	2 mM
dNTPs	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM	0.2 mM
"primer"	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM
QiagenTaq	1 U/μ	1 U/μ	1 U/μ	1 U/μ	2 U/μ

Inicialmente se hicieron las pruebas para optimizar los protocolos para las mezclas de la PCR y para el programa del termociclador. Tres pares de cebadores se lograron optimizar para *C. hominivorax*: 7, 8 y 9. Sin embargo no se logró amplificar los cebador: 3, 4 y 10.

2. OPTIMIZACION DE LOS CEBADORES PARA *C. macellaria*

Debido a que los cebadores 7, 8 y 9 fueron los que se lograron optimizar para *C. hominivorax*, estos también se eligieron para el caso de *C. macellaria*. De los cuales se lograron optimizar el 8 y 9.

3. TAMAÑO DE LAS REGIONES AMPLIFICADAS

El tamaño de las regiones amplificadas del cebador 7 fue de 1,110 pb (abarca la región NADH4), para el cebador 8 fue de 1,000 pb (abarca parte de las dos regiones NADH4 y NADH5 y el His ARN). Finalmente el cebador 9 fue de 1,038 pb (abarca la región NADH5) (Anexo 2).

4. RELACIONES FILOGENETICAS DE LAS CEPAS

Como se explicó en la metodología, debido a que todos los análisis (NJ, Parsimonia, Máxima Verosimilitud, Bayesiano) mostraron la misma tendencia, los árboles que se presentan en la investigación son los obtenidos con el análisis Bayesiano. A continuación se describen los resultados obtenidos por cada región evaluada y el consenso.

4.1. Cebador 7

Los resultados de análisis de las secuencias obtenidas con el cebador 7 muestran un árbol con una politomía basal para cuatro clados. El primer clado formado por las cepas de Quintana Roo (CECH) y Oaxaca (LH) presenta un soporte Bayesiano de 86. El segundo clado, formado por las cepas procedentes de Chiapas (PA-34 y Limón) posee un soporte Bayesiano de 83. El tercer clado, presentó un soporte Bayesiano débil, de 66, constituido por las cepas de Panamá (P95) y Costa Rica (CR-92) y finalmente el cuarto clado comprendiendo solo la población de Brasil. En general, estos resultados indican que a nivel de la región mitocondrial que abarca principalmente el gen NADH5 las relaciones filogenéticas muestran una sólida tendencia monofilética entre los clados de Oaxaca y Quintana Roo con el clado de las cepas de Chiapas. A pesar que el tercer clado está bien definido, como se había mencionado, su soporte es un poco débil en esta región (Figura 4).

4.2. Cebador 8

Los análisis de las secuencias obtenidas con el cebador 8 muestra un árbol con poca variabilidad entre las cepas. Se observó una politomía a nivel basal y de caldos. Uno formado por las cepas de Quintana Roo (CECH) y Oaxaca (LH) con un soporte Bayesiano de 99. El segundo está formando por las cepas de Chiapas (Limón y PA-34) con un soporte Bayesiano de 61 (Figura 5).

4.3. Cebador 9

El árbol filogenético de las secuencias obtenidas del cebador 9, que amplifica principalmente la región NADH4, presenta un nodo basal de donde nacen dos clados bien definidos, el primero que agrupa a las cepas de Oaxaca (LH) y Quintana Roo (CECH), presenta un soporte Bayesiano de 84. El segundo nace de una rama de donde salen dos grupos, el primero formado únicamente por la población de Brasil, mientras que el segundo presenta un soporte Bayesiano de 77, de donde nacen nuevamente dos ramas, la primera formando un grupo con las cepas de Chiapas (Limón y PA-34) con un soporte Bayesiano de 96, siendo este también un grupo monofilético sólido. El segundo grupo esta formado por las cepas de Panamá (P-95) y Costa Rica (CR-(92) (Figura 6).

4.4. Consenso

Finalmente se unieron las tres regiones amplificadas, abarcando completamente NADH4 – His tRNA – NADH5, mostrando consistencia. Este árbol formó los mismos cuatro clados de los cebadores 7 y 9, pero con un mayor soporte, siendo estos: el primero formado por las cepas de Quintana Roo (CECH) y Oaxaca (LH) con un 100 de soporte

Bayesiano, el segundo con un soporte Bayesiano de 91 y está comprendido por tres ramas de donde nacen tres grupos. El primero formado únicamente por la población de Brasil, el segundo un con soporte Bayesiano de 100, formando por las cepas de Chiapas (Limón y PA-34) y el tercero con un soporte Bayesiano de 94 formado por las cepas de Panamá (P-95) y Costa Rica (CR-92) (Figura 7).

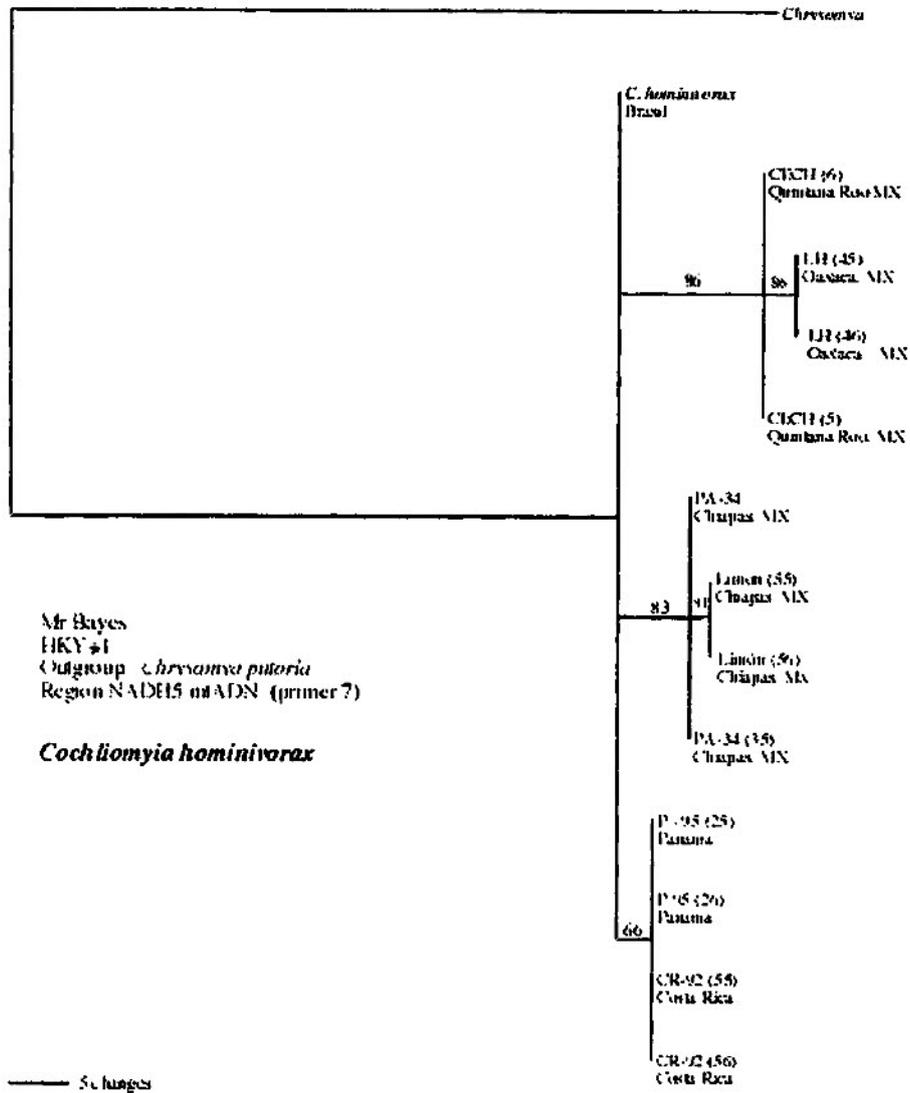


Figura 4. Árbol filogenético de las cepas *C. hominivorax* de la región NADH5, mtADN

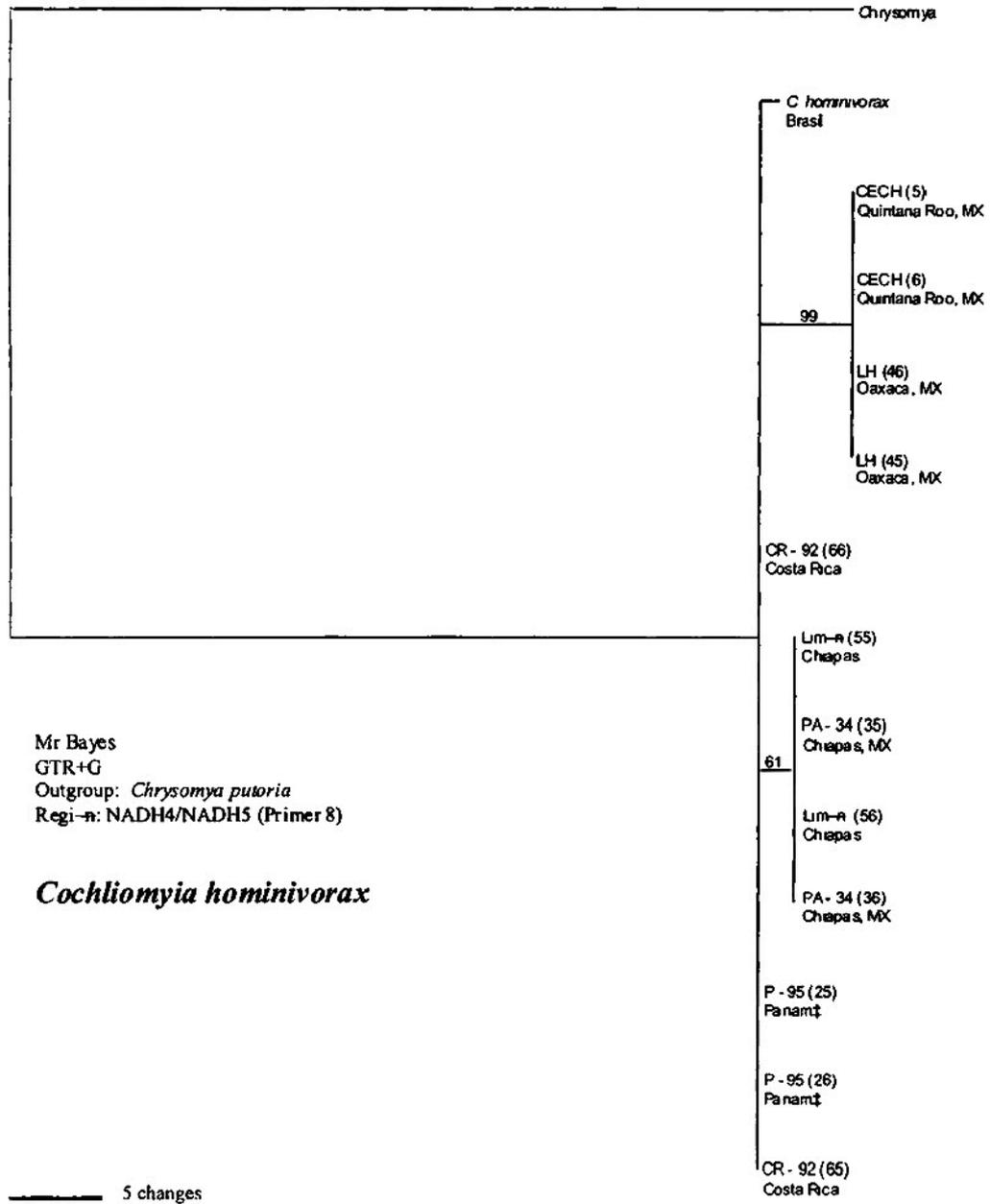


Figura 5. Árbol filogenético de las cepas *C. hominivorax* de la región NADH4/NADH5, mtADN

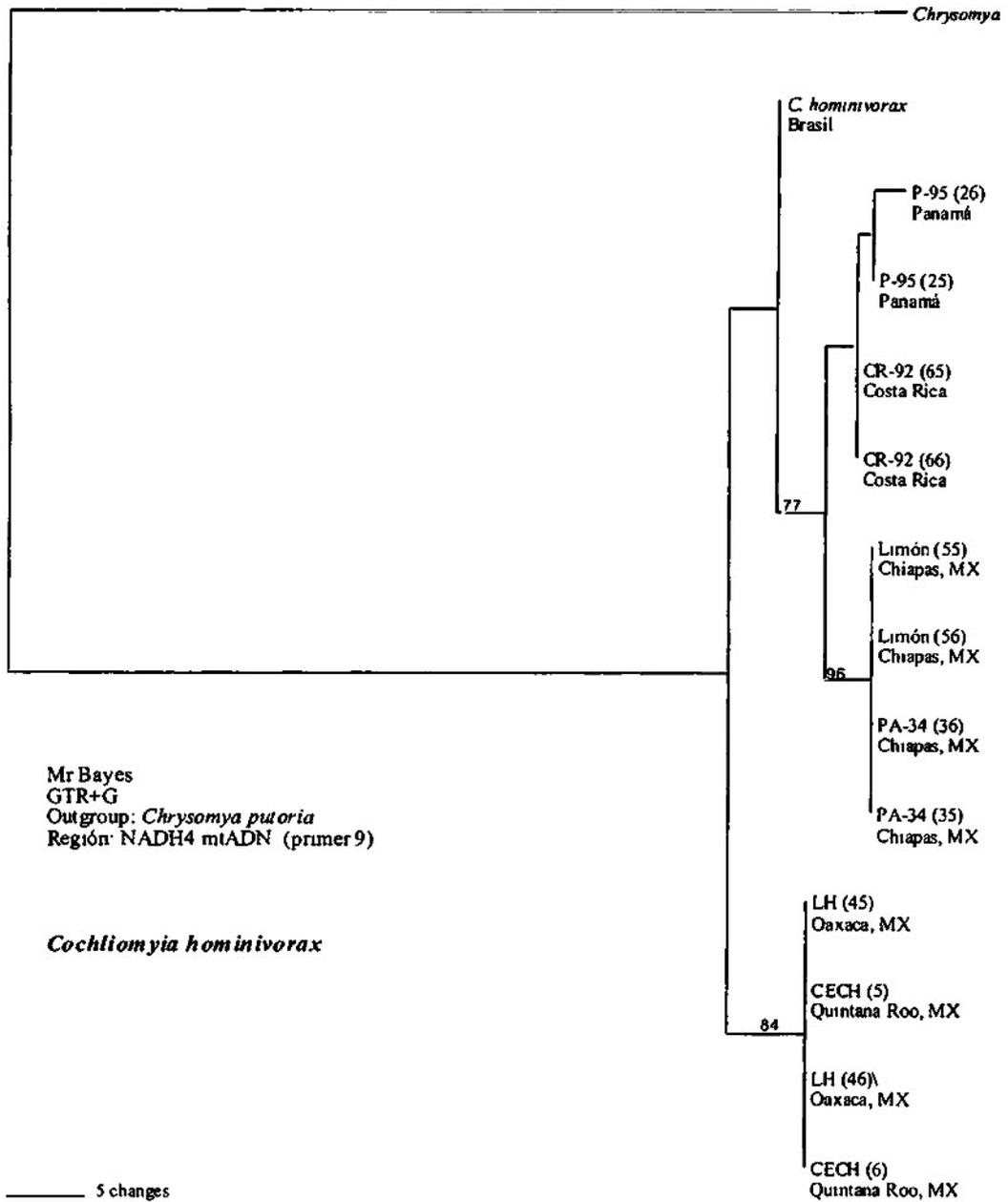


Figura 6. Árbol filogenético de las cepas *C. hominivorax* de la región NADH4 mtADN

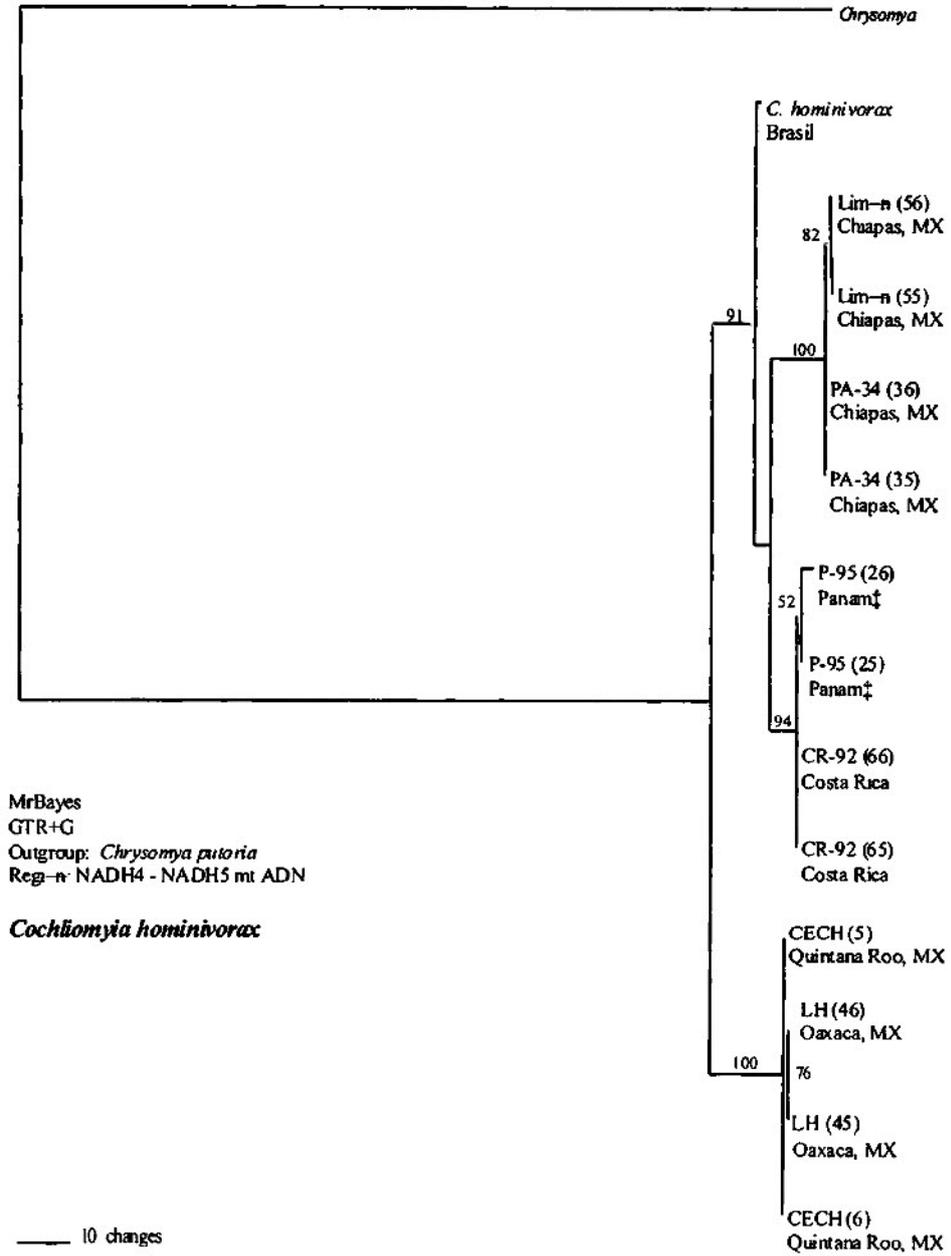


Figura 7. Árbol filogenético del consenso de las cepas *C. hominivorax*: región NADH4 -NADH5, mtADN

DISCUSIÓN

1. Regiones Amplificadas

Los cebadores 7 y 9 muestran la misma topología formando cuatro clados definidos. Sin embargo, el cebador 8, como se explicó anteriormente, amplifica una pequeña región de los genes NADH 4 y NADH5 y la región completa del tRNA. Los resultados obtenidos con el cebador 8 demuestran una politomía para las muestras procedentes de Panamá, Costa Rica y Brasil. Esto puede darse debido a una baja variabilidad en la secuencia de esta región.

2. Caracterización molecular de las cepas de *C. hominivorax* y *C. macellaria*

Las secuencias obtenidas de las distintas cepas de *C. hominivorax* de las regiones amplificadas pertenecen al ADN mitocondrial, que representa la expresión genética de la línea maternal y es considerada como una herramienta muy importante para realizar estudios de poblaciones intraespecíficas. En estas secuencias se pueden observar la existencia de un polimorfismo a través de los cambios que se presentaron en las bases nitrogenadas entre las cepas; así como los sitios en donde se dan dichos cambios.

Estos cambios son importantes porque son la principal fuente de información que se utilizó para realizar los análisis filogenéticos que permitieron demostrar la relación entre las cepas, tomando en cuenta que estas proceden de zonas actualmente erradicadas, las cuales fueron colectadas y reproducidas en laboratorio.

La variación genética que se observó en los fragmentos amplificados del mtADN permite aplicar otros métodos, tales como: PCR-RFLP. Este método permite una rápida identificación de los diversos haplotipos que puedan estar presentes y establecer relaciones entre poblaciones.

Como se ha mencionado, *C. macellaria* es considerada una plaga secundaria del gusano barrenador del ganado y es morfológicamente muy similar a este, principalmente en los primeros estadios larvales. Uno de los requisitos indispensables para la eficiencia del programa de erradicación del gusano barrenador del ganado es la correcta identificación de las especies en los sitios muestreados, debido a que un error puede llevar a liberaciones innecesarias, además del alto costo de las mismas para la erradicación de áreas erróneamente identificadas como infestadas o el diagnóstico erróneo de una re-infestación. El aporte de las secuencias de la región amplificada para *C. macellaria* y *C. hominivorax* proporciona información genética para diferenciarlas entre sí, principalmente en los muestreos realizados por el programa de erradicación del gusano barrenador del ganado.

El desarrollo de estas secuencias en la presente investigación aportan información importante para estas regiones del genoma (NADH4/NADH5), permitiendo la comparación entre cepas y poblaciones. Además, estas ayudarán para futuras comparaciones con otros estudios entre especies del orden Diptera. Por ejemplo, la región NADH4, ha sido estudiada y comparada entre especies del género *Drosophila* por Yu, *et al.* (1999).

Para el caso de *C. macellaria*, el aporte también es muy importante debido a que GenBank reporta secuencias de los genes tRNA Ile, 28S rRNA, subunidad I de Citocromo Oxidasa B, Subunidad I de Citocromo Oxidasa (COI), tRNA-Leu y Citocromo Oxidasa II (COII). Las regiones secuenciadas en esta investigación es una contribución que ayuda a incrementar la información de su genoma.

3. Relación molecular entre las 6 cepas de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel).

El análisis de los resultados muestra que las cepas de Quintana Roo y Oaxaca son genéticamente muy similares y forman un solo clado. Mientras que las cepas procedentes de Chiapas forman un clado separado y muestran una mayor divergencia genética con respecto a las cepas de Quintana Roo y Oaxaca (Figura 9). De manera que es muy importante señalar que a pesar que los estados de Oaxaca, Chiapas y Quintana Roo son geográficamente cercanos en el territorio del área sur de México, las cepas de estas regiones se separan filogenéticamente.

Una estrecha relación entre las dos cepas de Chiapas podría esperarse debido a la cercanía territorial entre ellas, factor que permite su posible apareamiento y retrocruza. Además, puede considerarse el movimiento interno del ganado en el territorio de Chiapas. Adicional a esto, el territorio de Chiapas está ubicada en un área montañosa, lo que podría limitar la dispersión de las moscas a otros territorios, principalmente a la planicie del norte de territorio de Chiapas. Por otro lado, el estado de Oaxaca está ubicado más cercano al territorio de Chiapas que al de Quintana Roo. Sin embargo, en el árbol del consenso, las cepas de Oaxaca (LH) y Quintana Roo (CECH) forman un clado

bien definido. Esto pudo haberse debido a un movimiento migratorio de los animales domésticos, principalmente el ganado, ya sea por comercialización o por pertenecer a fincas afines. La facilidad de dispersión de las propias moscas es relativamente limitada, debido a que el territorio de Oaxaca está localizado en un área ampliamente montañosa, lo que puede funcionar como una barrera natural para la dispersión de las moscas. Aunque, este territorio también presenta una planicie que se extiende hacia Quintana Roo, pudiendo facilitar esta vía para su dispersión entre ambos territorios.

Con respecto al último clado, conformado por las cepas de Costa Rica (CR-92) y Panamá (P-95). Esta relación filogenética pudo haberse debido a las mismas razones que el clado formado por las dos cepas de Chiapas, ambos países están territorialmente cercanos. Además, es muy probable que se diera el movimiento del ganado, así como la migración de las moscas entre zonas fronterizas entre los dos países.

En el árbol filogenético del consenso, se observa una relación entre el clado formado por las dos cepas de Chiapas y el constituido por las cepas de Panamá y Costa Rica. Esto indica una relación monofilética más cercana. Debido a esto, es posible considerar que el territorio de Chiapas, la ciudad de San José, Costa Rica y la Ciudad de Panamá tienen en común la cercanía con la carretera Panamericana. Por lo que se puede suponer que este parentesco se deba al tránsito o migración del ganado. Este movimiento vehicular pudo haber contribuido de alguna manera a que se diera esta relación genética. Pese a esto, los clados se dividen conservando claramente su relación anteriormente mencionada.

Sin embargo, en el estado de Oaxaca, también pasa la carretera Panamericana. Entonces, por qué no existe relación entre estas cepas con Chiapas? Para contestar esto hay que tomar en cuenta que el territorio de Chiapas está estrechamente cercano con los países centroamericanos, por lo que la comercialización ganadera es más fácil que se llevara a cabo entre Chiapas y Guatemala (áreas fronterizas) y los demás países de Centro América que con los de Quintana Roo (que se encuentra lejos de la carretera Panamericana) y Oaxaca. Adicional a esto, el departamento de Petén, Guatemala, que está muy cercano a Quintana Roo, es un departamento de áreas boscosas con una cobertura de 1,880,000 Ha. perteneciente a la Reserva de la Biosfera Maya, pudiendo representar una barrera natural entre el territorio de Quintan Roo con Guatemala (López y Véliz, 1999).

Esta misma cercanía entre Chiapas y Guatemala pudo influir en su relación filogenética, debido a que se ha reportado que la capacidad de dispersión de las moscas ha alcanzado hasta los 290 Km en dos semanas (Jasiorowski, 1993). Esta distancia abarca territorialmente desde Chiapas hasta las fronteras con Guatemala, El Salvador y Honduras. Adicional a esto el territorio de Chiapas tiene 653.55 Km de frontera con Guatemala, convirtiéndolo en la puerta de entrada y salida con el mercado Centroamericano (Secretaria de Desarrollo Económico del Estado de Chiapas, 2006; Rodríguez, 1996).

En cuanto a la relación filogenética entre las seis cepas evaluadas con la población de Brasil se observó una relación más cercana con el clado formado por las cepas de

Chiapas, Panamá y Costa Rica. En relación a las áreas fronterizas de Panamá con América del Sur, la provincia de Darién es limítrofe con Colombia, donde se encuentra el Tapón del Darién, que se extiende a lo largo de la frontera en un 90%. Esta región, alberga una rica biodiversidad de flora y fauna, que incluye muchas especies endémicas y en peligro de extinción. Además de su riqueza biológica, presenta una gran extensión de áreas protegidas (Conte, 2006). A pesar de la existencia de esta barrera natural, en 1972 fue firmado un acuerdo cooperativo entre Panamá y Estados Unidos, creándose para ello la Comisión para la Prevención de la Fiebre Aftosa (COPFA), donde se prohíbe la cría, ceba, compra o venta de ganado vacuno y porcino en una franja de 20 millas (32 Km) paralela a la frontera con Colombia que limitó las explotaciones a las existentes a la fecha de la ley en el resto de la provincia (Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 1978). Tomando en cuenta que la capacidad de dispersión de mosca del gusano barrenador del ganado es hasta 290 Km en dos semanas, es posible la dispersión y migración de la mosca entre Panamá y Colombia. Debido a lo anterior es importante considerar la implementación de una barrera permanente de liberación de moscas estériles en toda el área fronteriza de Panamá con Colombia.

Adicional a todos los factores anteriormente mencionados, también puede considerarse al istmo de Panamá como un puente biogeográfico. En Panamá, conjuntamente con Colombia y Ecuador se localiza una de las biotas más abundantes de tierras bajas, de excepcional riqueza y endemismo, con un amplio rango de especies. Las características fisiogeográficas del istmo de Panamá, también han generado una riqueza faunística que lo ubica como una de las regiones de máxima diversidad biológica del

planeta y ha facilitado el intercambio de especies entre el continente americano (Autoridad Nacional del Ambiente, 2003).

Para poder hacer una discusión más precisa de la relación filogenética entre las cepas de Costa Rica, Panamá y Brasil, es importante conocer la caracterización molecular de otras poblaciones de América del Sur. Ya se han realizado estudios moleculares entre poblaciones de Brasil, por ejemplo Azeredo-Espin (1993) realizó una caracterización molecular de doce poblaciones de *C. hominivorax* procedentes de siete localidades de Brasil, demostrando alta variabilidad. Vargas y Azeredo-Espin (1995) encontraron 15 haplotipos entre cuatro poblaciones de *C. hominivorax* procedentes de São Paulo, los cuales fueron interpretados como un resultado que reduce el flujo de genes entre estas poblaciones. El cladograma de la distribución geográfica de los haplotipos observados sugiere que las muestras del barrenador probablemente pertenecen a un mismo linaje evolutivo. Estos patrones que indican polimorfismo intraespecífico entre distintas poblaciones de Brasil lo demostraron Litjens *et al.* (2001) con el estudio de cinco poblaciones de Brasil.

Por otro lado Lyra *et al.* (1995) realizaron estudios en siete poblaciones de *C. hominivorax*, procedentes de Uruguay donde también demostraron un alto polimorfismo. El índice de similitud, la divergencia promedio de nucleótidos y la varianza del análisis molecular demostraron que no hay evidencia de diferenciación entre subpoblaciones indicando que las poblaciones de Uruguay forman una panmixia. A pesar de que todas estas investigaciones han sido realizadas en algunos países de América del Sur, no se

conocen las relaciones filogenéticas de toda la región sur americana y su relación con las de Norte América, Centro América y el Caribe.

Otro factor muy importante que hay que considerar en las poblaciones sur americanas, es que durante muchos años han sido controladas por varios métodos, principalmente con insecticidas, los cuales con el tiempo pueden llegar a obtener resistencia selectiva, producto de mutaciones. En 1962, LaChance y Hopkins realizaron estudios en mutaciones de *C. hominivorax*, considerando que estas podrían desarrollar efectos como: desigualdad en la proporción del sexo en la progenie, causar la muerte de los homocigotos, afectando a un solo sexo de la especie o produciendo otras características genéticas útiles en programas de entomología. Ellos encontraron nueve mutaciones, que afectan principalmente el color de cuerpo y la venación de las alas. En Brasil, *C. hominivorax* ha sido controlada mayormente con insecticidas organofosforados y su uso inadecuado pudo dar lugar a resistencia por selección de las moscas. Cambios en la actividad de la carboxilesterasa han sido asociados con el insecticida organofosforado. Por ejemplo, Carvalho *et al.* (2006) aislaron y caracterizaron el gen E3 en *C. hominivorax*, el cual presentó similares substituciones responsables por estar sometidos al organofosforado, como lo presentó la especie *Lucilia cuprina* (Calliphoridae).

En general, una relación filogenética similar a nuestros resultados ha sido reportada en estudios con *C. hominivorax* en otras poblaciones. Por ejemplo, Roehrdanz (1989) demostró que dentro de los 16 haplotipos encontrados se presentó una relación de

parentesco entre las cepas de Oaxaca con las de Quintana Roo, mientras que las cepas de Chiapas, Costa Rica y Jamaica formaban haplotipos distintos. Skoda *et al.* (2002), estudiaron las poblaciones de *C. hominivora*, procedentes de México (Chiapas, cepa PA-34), Costa Rica, Brasil y Jamaica. Ellos demostraron la existencia de un polimorfismo intraespecífico entre las poblaciones, obteniendo a través del análisis de agrupamiento UPGMA y posteriormente bootstrapping cuatro clados definidos. Asimismo, estos investigadores obtuvieron un clado formado por las poblaciones procedentes de México, otro formado por las poblaciones procedentes de Costa Rica. Un tercero constituido por las poblaciones procedentes de Brasil y un último con las poblaciones procedentes de Jamaica. Adicional a estos clados, ellos demostraron una relación entre la cepa de México (Chiapas, PA-34) con la de Costa Rica, aunque con un soporte de 54%.

Con todos estos análisis se puede conocer parte de la biogeografía histórica de *C. hominivorax*, debido a sus consistencia en la formación de los clados. A pesar de su capacidad de dispersión, las cepas demuestran su procedencia filogenética claramente. También, con esta investigación se aporta información de las regiones del ADN mitocondrial estudiadas previamente estudiadas, las que pueden ser comparadas con poblaciones de sur América, que actualmente son una plaga. Es importante continuar con estudios en el genoma del *C. hominivorax* en áreas donde actualmente es una plaga establecida, debido a que en un futuro puede entrar el programa de erradicación a Sur América. De esta manera se asegurar el éxito de las liberaciones de moscas estériles producidas en laboratorio para la erradicación, así como evitar la re-infestación en las áreas erradicadas.

CONCLUSIONES

1. Se optimizaron tres cebadores para *C. hominivorax*: el cebador 7 (F: N5-J-7660; R: N5-N-8853), el cebador 8 (F: N5-J-8621; R: N4-N-9676) y el cebador 9 (F: N4-J-9580; R: NL-N-10740). Amplificando las regiones del mtADN NADH4 –tRNA-NADH5.
2. Para *C. macellaria* se lograron optimizar únicamente dos “primers”: el primer 8 (F: N5-J-8621; R: N4-N-9676) y el primer 9 (F: N4-J-9580; R: NL-N-10740) amplificando la región del mtADN NADH4 más una pequeña región de NADH5.
3. Se presentó un evidente polimorfismo que agrupa a las cepas en 3 clados definido y la población de Brasil obtenida del Genbank queda fuera de estos tres clados. Los clados son:
 1. Las dos cepas de Chiapas (Limón y PA-34)
 2. Las cepas de Panamá y Costa Rica (P-95 y CR-92)
 3. Las cepas de Quintana Roo y Oaxaca (CECH y LH)
 4. Población de Brasil
4. Las diferencias genéticas encontradas entre *C. macellaria* y *C. hominivorax* permite distinguir las molecularmente.

RECOMENDACIONES

Optimizar los demás cebadores que quedaron sin amplificar en este estudio, tanto para *C. hominivorax* como para *C. macellaria* debido a que esta información permitirá las comparaciones de otras regiones del genoma entre ambas especies, lo que facilitará la separación entre ellas a nivel del genoma mitocondrial.

Continuar con los estudios de las cepas trabajadas, incluyendo las moscas estériles producidas en laboratorio y su comparación con cepas actualmente establecidas como especies nativas procedentes de Sur América e islas del Caribe. Información que permitirá conocer las relaciones filogenéticas entre ellas lo que aportará conocimientos que contribuirán al éxito del programa.

Dentro de los estudios genéticos también se recomienda incluir los estudios con genes nucleares de *C. hominivorax*.

Compararlas también con poblaciones controladas con insecticidas y áreas reinfectadas tomando en cuenta la posible resistencia a ciertos insecticidas.

**LITERATURA CITADA
REFERENCES CITED**

- Adams, T. 1979. The reproductive physiology of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). II. Effect of constant temperatures on oogenesis. *Journal Medical Entomology* 15: 484 – 487.
- Anderson, T. y Leppla, N. 1992. *Advances in insect rearing for research and pest management*. Oxford. U.S. p. 393 – 403
- Alvarez, L. 1996. Manual de identificación del gusano barrenador del Ganado *Cochliomyia hominivorax* y de *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Screwworm Program. México. ARS – USDA. CDRoom. 80 diapositivas.
- Anónimo. 1988. Catastro de las series de precipitaciones medidas en Costa Rica. Ministerio de Recursos Naturales Energía y Minas / Instituto Meteorológico Nacional, San José, Costa Rica. 221 p.
- Autoridad Nacional del Ambiente. Proyecto para la consolidación del corredor biológico mesoamericano. 2003. El corredor biológico mesoamericano. Caracterización de corredores locales de desarrollo sostenible en el área de la Región Occidental de Panamá. Panamá. 117 p.
- Azeredo-Espin, A. L. M. 1993. Mitochondrial DNA variability in geographical populations of the Brazilian screwworm fly. International Atomic Energy Agency (IAEA-SM-327/17), Vienna, Austria (1993) pp. 161-165.
- Baumhover, A. 1966. Eradication of the Screwworm fly. An Agent of Myiasis. *J. The American Medical Association*. 169: 240 – 248.
- Baumhover, A.; Husban, Ch. and Graham, A. 1969. Srew-worms. Entomology Research Division, U.S. Department of Agriculture, Oxford, North Carolina. U.S. 533 – 542 p.
- Bernal, A. 2002. Genética Molecular para el Inventario y la caracterización de la biodiversidad. Electroforesis. Unidad de Biotecnología. CIAT. Panamá. P. 31 -34.
- Boros, L.; Boros, H.; Boros, F.; Algarte, P. y Bordini, J. 2006. Miiase Labial. *Revista Dens*. 14: 1 – 10.
- Bram, R. A. 1985. Future screwworm eradication program. Symposium of eradication of the screwworm from the United States and Mexico, Entomology Society American. Collage Park , Maryland. Páginas 37 -40.

- Butler, J. F. 1996. Effects of temperature on *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae) development. USA. Journal Medical Entomology 33:901-905
- Byrd, J. H. 1995. The effects of temperature on flies of forensic importance. M.S. tesis. USA. University of Florida. 197 p.
- Campillo, H. 1988. Diccionario Quintana Roo Enciclopedia Regional. Héctor Editorial Fernández Editores. México. p. 3-6.
- Carvalho R.; Torres T. and Azeredo-Espin A. 2006. A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. Veterinary Parasitology. 140:344-51.
- Chaudhury, L.; Alvarez, A.; Lopez, L. 2000. A new meatless diet for adult screwworm (Diptera: Calliphoridae). Veterinary Entomology 93: 1398 – 1401
- Conte, J. 2006. Patrimonio de la Humanidad y Reserva de la Biosfera por la UNESCO, el Tapón del Darién ya no existe. www. ecoportal.net
- COPEG, 2005. Comisión Panamá – Estados Unidos, Para la Erradicación y Prevención del Gusano Barrenador del Ganado. Página web. <http://www.copeg.com>.
- Cox, T. y Sinclair, J. 1998. Biología Molecular en Medicina. Ed. Médica Panamericana. España. 366 p.
- Crozariol, A. 2005. Batalha contra as Bicheiras. Rev. Gestão Pecuária 6: 26 – 28
- Crystal, M. 1967. Reproductive behavior of laboratory – reared screwworm flies (Diptera: Calliphoridae). Journal Medical Entomology 4: 443 – 450.
- Cunningham, E.P. 1993. Manual para el control de la mosca del gusano barrenador del ganado, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). Guía para la identificación de las moscas del género *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae). Vol. 2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Italia. 23p.
- Cushing, E.; Hall, D. 1973. Some morphological differences between the screwworm fly *Cochliomyia americana* and other closely allied or similar species in north America. Proceedings of the Entomological Society of Washington. 7: 195 – 201.
- Diccionario Geográfico de Panamá. 2001. Facultad de Humanidades. Departamento de Geografía. Ed. Universitaria. Segunda edición. Vol II p. 109 – 127.
- Drugueri, L. 2004. *Cochliomyia hominivorax*, miasis por gusano barrenador. Universidad de Buenos Aires. Argentina. Zoe. 158 p.

- Elizalde, A. 2005. Cambio de Michoacán. México – Estados Unidos. Busca reforzar acciones para la erradicación del gusano barrenador. Cambio de Michoacán. 8 de junio de 2005.
- Embajada de Estados Unidos en Costa Rica. 2006. Pagina web: www.usembassy.or.cr
- Embajada de los Estados Unidos en Costa Rica. 2005 Programa para la Erradicación del Gusano Barrenador. Web: www.usembassy.or.cr
- Embajada de los Estados Unidos en Panamá. 2005. Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal. Pagina web: www.panama.usembassy.gov
- Enciclopedia Microsoft Encarta. 2004. Microsoft Corporation. CD Room.
- Erziclioglu, Y. 1987. The larvae of some blowflies of medical and veterinary importance. Medical and Veterinary Entomology 1: 121 – 125
- FAO. 1992. The New World screwworm eradication program: North Africa 1988 – 1992. FAO. Rome, Italy.
- FAO. 1993. Manual para el control de la mosca del gusano barrenador del ganado, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Italia. 24 p.
- FAO. 2005a. Gusano barrenador del ganado del nuevo mundo. . Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Italia. P. 6 -13
- FAO. 2005b. Miasis Cutánea. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Página web: www.fao.org
- FAO. 2005c. La cooperación internacional en el control, erradicación y prevención del gusano barrenador del ganado. 110 p.
- Freifelder, D. 1991. Técnicas de bioquímica y biología molecular. Ed. Reverté mexicana. México. 631 p.
- Gaitán, E. 2002. Genética Molecular para el Inventario y la caracterización de la biodiversidad. Secuenciación. Unidad de Biotecnología. CIAT. Panamá. P. 40 -43.
- Gaitán, E. y Gallego, G. 2002. Genética Molecular para el Inventario y la caracterización de la biodiversidad. Reacción en cadena de la polimerasa PCR. Unidad de Biotecnología. CIAT. Panamá. P. 35 -39.

- Gallego, G. 2002. Genética Molecular para el Inventario y la caracterización de la biodiversidad. Extracción del ADN. Unidad de Biotecnología. CIAT. Panamá. P. 28 -30.
- Gómez, L.y Herrera, W. 1986. Vegetación de Costa Rica, L. Gómez. In Vegetación y clima de Costa Rica. Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. p. 271 - 273.
- Gomes, A.; Koller, W.W.y Barros, A.T.M. 2000. Sazonalidade da mosca-varejeira, *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), na região dos cerrados, Campo Grande, MS. Revista Brasileira Parasitologia Veterinária, 9(2): 125-128.
- Gomes, A.; Koller, W. W. ; Honer, M. R. y Silva, R. L. 1998. Flutuação populacional da mosca *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera; Calliphoridae) capturada em Armadilhas Orientadas pelo Vento (W.O.T.), no Município de Campo Grande, MS. Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria, v. 7, n.1, p. 41-45
- Gordillo G. y Ortiz, O. 1977. Diccionario Biográfico de Chiapas. Costa Amic. Tuxtla Gutiérrez, México. P 23 – 36.
- Guimaraes, J. H. 1983. Moscas: biología, ecología e controle. Agroquímica Ciba Geigy, 21: 20-26.
- Guimaraes, J. H.; Prado, A. y Lindares, A. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). Revista Brasileira de Entomologia. 22: 53-60.
- Harrison, J.y Langdale, J. 2006. Techniques for Molecular Analysis. A step guide to phylogeny construction. The Plant Journal. 45: 561 – 572.
- Herrera, W.y Gómez, L. 1985. Clima de Costa Rica, Vegetación y clima de Costa Rica. Universidad Estatal a Distancia. San José. p.57 – 62
- Herrera, W.y Gómez, L. 1993. Mapa de Unidades Bióticas de Costa Rica. Instituto Geográfico de Costa Rica / Servicio Geodésico Interamericano, San José, Costa Rica. p. 285
- Hidromet. 2006. Hidrometeorología. Republica de Panamá. ETESA. Pagina web: www.hidromet.com.pa
- Hoelzel, A. 1992. Molecular Genetic analysis of populations a practical approach. Oxford University Press. United Stated. 351 p.
- Hoy, M. 2003. Insect molecular genetics, an introduction to principles and applications. Academic Press. Sec. Edition. USA. 544P.

- INEGI. 1998. Síntesis de Información Estadística I y II . México. Página Web: www.inegi.gob.mx
- INEGI -DGG. 1999. Superficies Nacional y Estatales. México. Página Web: www.inegi.gob.mx
- INEGI . 2000. Marco Geoestadístico, 2000. México. Pagina Web: www.inegi.gob.mx
- Insectos plaga acciones contra el gusano barrenador del ganado - Insectos de Argentina y el Mundo. 2004. Pagina web: <http://axxon.com.ar/mus/Insectos.htm>
- Jaramillo, F. y Villada, M. 1999. Determinación del grado de diversidad genética de seis poblaciones de la mosca del gusano barrenador del ganado, por medio de la secuenciación y análisis de RFLP,s del gen COI del DNAm. Tesis de Maestría. Universidad de Santa María La Antigua. Panamá. 94 p.
- Jasiorowski, H. 1993. Manual for the control of the screwworm fly *Cochliomya hominivorax* Coquerel. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Italy. 85 p.
- Krafsur, E. 1987. Climatological correlatos of screwworm, *Cochliomyia hominivorax* abundance in Texas, U.S.A. Medical and Veterinary Entomology. 1, 71 – 80
- Krafsur, E.y Lindquist, D. 1996. Did the Sterile Insect Technique or Weather eradicate screwworms (Diptera: Calliphoridae from Libya) Journal Medical Entomology 33(6): 877 – 887.
- Knipling, E. 1983. Sterile Insect Technique as a Screwworm control measure: the concept and its development. Symposium; eradication of the screwworm. Miscellaneous Publication Vol. 62. p. 4 – 7.
- LaChance, L.y Hopkins, D. 1962. Mutations in the screwworm fly. Journal Economic Entomology 55: 733- 737.
- Lessinger, A. y Azeredo- Espin, A. 2000. Evolution and structural organization of mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. Medical and Veterinary Entomology. 14: 71 –80.
- Lessinger, A.; Junqueira, A.; Lemos, T.; Kemper, E.; da Silva, F.; Vettore, a.; Arruda, P.; Azeredo-Espin, A. 2000. The mitochondrial genome of the primary screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). Insect Molecular Biology 9: 521 – 529.

- Litjens, P.; Lessinger, A. y Azeredo – Espin, A. 2001. Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med.Vet. Entomol.* 15: 183 – 188.
- López, A.y Véliz, R. 1999. Breve descripción de los recursos boscosos de Guatemala. Memoria del Taller Sobre el Programa de Evaluación de los Recursos Forestales en once Países Latinoamericano. Costa Rica. CATIE. 157 p.
- Lyra, M.; Fresia, P.; Gama, S.; Cristina, J.; Klaczko, y Azeredo –Espin, A. 2005. Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. *Journal Medical Entomology.* 42: 589 – 595.
- Maliphan, S.; Pornkulwat, S.; Krumm, J.; Skoda, S.; and Foster, J. 2006. PCR- RFLP analysis of mitochondrial DNA in Screwworms (Diptera: Calliphoridae.) University of Nebraska-Lincoln. Department of Entomology. United Status of America. 11 p.
- Narang, S.y Degrugillier, M. (1995). Genetic fingerprinting of the screwworm (Diptera: Calliphoridae) infestation in North Africa by mitochondrial DNA markers. *Florida Entomol.*78: 294 – 304.
- Poudevigne, F. 1995. Ecología de l Miasis, aplicación a un nuevo sistema de colecta. Seminario sobre el gusano barrenador del ganado. Panamá. 10 p.
- Rodríguez, F. 1996. Diccionario Municipal de Guatemala. Instituto de Estudios y Capacitación Cívica Guatemala. Guatemala. Segunda edición. Fondo de cultura editorial. 262 p.
- Roehrdanz, R. 1989. Intraespecific gentic variability in mitochondrial DNA of the Screwworm Fly (*Cochliomyia hominivorax*). *Biochemic Genetic.* 27 :551 – 569.
- Romero, H. 2003. Gusano Barrenador. Universidad Autónoma de México. Imagen Veterinaria. Mexico. 57 p.
- Secretaría de Desarrollo Económico del Estado de Chiapas, 2006. Estado de Chiapas. Página Web: www.todosobrechiapas.com
- Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. 1978. Proyecto de Desarrollo Integrado de la Región Oriental de Panamá – Darién. Unidad Técnica del Proyecto Panamá – Darién durante el periodo 1975-1978. Gobierno de la República de Panamá. Programa de Desarrollo Regional. Panamá. 168 p.
- SEP. 1997. Historia y Geografía. Secretaria de Educación Pública. México. P. 45 – 78.

- Skoda, S.; Pornkulwat, S. and Foster, J. 2002. Random amplified polymorphic DNA markers for discrimination *Cochliomyia hominivorax* from *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Bulletin of Entomological Research*. 92: 89 - 96.
- Thomas, D. 1993. Behavioral Aspects of Screwworm Ecology. *Journal of the Kansas Entomology Society*. 66:13-30.
- Thomas, D.; Mangan, R. 1989. Habitat Preferences and dispersal patterns in native female screwworm flies (Diptera: Calliphoridae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 82: 332 - 339
- Valderrama, R. 2006. *Cochliomyia hominivorax* como agente de miasis en humanos en Medellín, Colombia. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia. Seminario Taller Internacional para la definición de estrategias de erradicación del Gusano Barrenador del Ganado -GBG- en el siglo XXI. Mex. 2006.
- Vargas, E. and Lima, A. 1995. Genetic Variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics*. 3: 237 - 255.
- Vargas, M. and Azeredo -Espin, A. 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of the screwworm, *Cochliomyia hominivirax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. *Biochemical Genetics*. 33: 237 - 255.
- Vargas- Terán, M.; Hofmann, H. and Tweddle, N. 2005. Impact of Screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. *Principles and Practice in area-wide integrated pest management*. IAEA. Netherlands. 629 - 650 p.
- Yu, H.; Wang, W.; Fang, S.; Zhang, Y.P.; Lin, F.J. and Geng, Z.C. 1999. Phylogeny and evolution of the *Drosophila nasuta* subgroup based on mitochondrial ND4 and ND4L gene sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 13: 556-65.

Anexo

ANEXO 1

EVALUACIONES REALIZADAS PARA EL PRIMER 7 EN LA ESPECIE *Cochliomyia macellaria*

Se realizó inicialmente el protocolo optimizado en la investigación para *C. hominivorax*. Posteriormente se evaluaron las siguientes concentraciones de MgCl₂: 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM y 3mM, a cada una de ellas se les realizó una prueba de gradiente de temperatura de de 50 °C a 60 °C. Luego se evaluaron dos concentraciones de MgCl₂ 1.5mM y 2.5 mM, con gradiente de temperatura de 40 °C a 50 °C. Todas estas pruebas descritas fueron corridas con el programa de PCR siguiente: Una desnaturalización inicial del DNA a 94 °C, por tres minuto, luego 94 °C por un minuto, entre 50 °C – 60 °C por 30 segundos (o de 40 a 50, dependiendo del gradiente evaluado). Un alargamiento de 72 °C por un minuto. Después de 35 termociclos ser hizo un alargamiento final a 72 °C por dos minutos.

Posteriormente se evaluaron las concentraciones MgCl₂ de 1.5 mM, 2 mM, 2.5mM y 3mM, con el mismo programa de PCR pero con el único cambio del tiempo del alargamiento de la nueva hélice de DNA a 72 °C por 10 minutos, en dónde tampoco se tuvo éxito por lo que fue necesario evaluar dos concentraciones de MgCl₂ 1.5 y 2.5 mM con los siguientes programas de PCR:

- Una desnaturalización inicial del DNA a 94 °C, por tres minuto, luego 94 °C por un minuto, 45 °C por 30 segundos, 72 °C por un minuto y luego cuatro termociclos; luego un paso de 94 °C por un minuto, 50 °C por 30 segundos. Un alargamiento de

72 °C por un minuto. Después de 30 termociclos se hizo un alargamiento final a 72 °C por dos minutos.

- Una desnaturalización inicial del DNA a 94 °C, por tres minutos, luego 95 °C por dos minutos, 50 °C por dos minutos, 72 °C por cuatro minutos y luego dos termociclos; luego un paso de 93 °C por un minuto, luego 50 °C por un minuto. Un alargamiento de 72 °C por cuatro minutos. Después de 32 termociclos, 93 °C por un minuto, 50 °C por un minuto y finalmente 72 °C por diez minutos.

Posteriormente se hicieron evaluaciones utilizando el mismo protocolo donde se evaluaron las siguientes concentraciones de MgCl₂: 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM y 3mM, a las que se le hizo prueba de gradiente de temperatura de de 50 °C a 60 °C. También se evaluaron las enzimas *TaqGold*, *Amplitaq* y *Qiagen*.

Se evaluaron con el protocolo inicial 3 diluciones diferentes de ADN: 1:10, 1:50 y 1:100. Posteriormente se hicieron evaluaciones utilizando el mismo protocolo, adicionándole DMSO al 5% y además donde se evaluaron las siguientes concentraciones de MgCl₂: 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM y 3mM, a cada una de ellas se les realizó una prueba de gradiente de temperatura de de 50 °C a 60 °C.

A pesar de todas estas evaluaciones realizadas el primer no trabajo.

ANEXO 2

**Secuencias de los individuos de cada región amplificada
REGION NADH5 mt ADN (primer 7)**

C.hominivorax individuo No.7. 5

TTGCTTGAATATTAATAATTATGGTAGTTGAAAATTATTTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAAATGATTTTGAAAATAATAATTATGGTATATTAGT
AATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCCCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCTGCTATAGCGGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTC
CATTCTTCTACCTTAGTAAGTCTGGGGTTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATTAAGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTAT
TGTCTGGTTTAAACAATATTCATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAGAAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAAATTGG
GTTTAAATAAAGAAATTTATCAATAGGGTTTTATAAATTAGCTTTTTTTTCATTTATTAACACATGCTTTGTTTAAGGCATTATTATTATGTGT
GCCGGGGCTATTATTCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTCGTTTAAATGGGAAGATTGAGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTA
ATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCITTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGGATTTAATTTTAGAAAATAGTTTCTTTATCTTATATAAA
TTTTTTTCTTTTTTTCTTTAATTTTTTCTACGGGATTAAGTGTGTTTATTCTTTTCGGTTAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAATTTT
TCATCTTTAAATATATTAATGATGAGGGTTGGGTAATATTA AAAAGTATAATAGGATTGTTGATTTTAAAGAAATTTTGGGGGAAGTATATTA
AGTTGATTAATTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTACCTTATTATTTAAAAATTAACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAG
GTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATAATTCATCTTATTTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTT
ATATTTCTACTTATGGTATTA [1059]

C.hominivorax individuo No.7. 6

TCGATTGGTGATGTGGCATTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATAATTATGGTAGTTGAAATTATATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAAAT
GATTTTGAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATAATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCCCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCTGCT
ATAGCGGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTCCATTCTTACTCTAGTAACTGCTGGGGTTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATTAAG
AAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTTGCTGGTTTAAACAATATTCATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAGAA
GATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTTAAATAAAGAATTTTATCAATAGGGTTTTATAAATTAGCTTTTTTTTCATTTATTAACA
CATGCTTTGTTTAAAGGCATTATTATTATGTGTGCCGGGGCTATTATTCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTGTTTTAATGGGAAGATTG
AGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCITTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGGATTT
AATTTTAGAAAATAGTTTCTTTATCTTATATAAATTTTTTTTCTTTTTTCTTTAATTTTTTCTACGGGATTAAGTGTGTTTATTCTTTTCGGTTA
GTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAATTTTTTCATCTTTAAATATATTAATGATGAGGGTTGGGTAATATTA AAAAGTATAATAGGATTG
TTGATTTTAAAGAAATTTTGGGGGAAGTATAATTAAGTTGATTAATTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTACCTTATTATTTAAAAATTTAA
CAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATAATTC
ATCTTATTTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1098]

C.hominivorax individuo No 7.25

ATCGAATTGGTGATGTGGCTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATAATTATGGGAGTTGAAATTATATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAA
ATGATTTTGAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATAATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCTG
CTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTTTCTTCTACTTTAGTAACTGCTGGGGTTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATTA
AGAAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTGCTGGTTTAAACAATTTTATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAG
AAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTTAAATAAAGAATTTTATCTATAGGGTTTTATAAATTAGCTTTTTTTTCATTTATTA
CACATGCTTTGTTTAAAGGCATTATTATTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCAATAATAAATAAATTGTCAGGATATTGTTTTAATAGGAAGAT
TGAGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCITTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGGA

TTAATTTTAGAAAAGTTCCTTATCTTATATAAAA TTTTTTTCITTTTTTCITTAATTTTTTTCTACGGGATTAAGTGTGGTTATCTTTTCGG
 TTAGTTTATTACAATAACTGGTGATTCTAA TTTTTCATCGTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATTTAAAAAGTATAATAGGA
 TTATTGATTTAAGAAATTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAATTTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTTACCTTATTATTTAAATTTAT
 TAACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCITTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATAA
 TTCATCTTATTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAAT-AT [1099]

C.hominivorax individuo No 7.26

ATCGAATTGGTGATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTTAAATTATGGGAGTTGAAATTATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAA
 ATGATTTTGAAAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCTG
 CTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTTCACTTCTACTTTAGTAACTGCTGGGGTTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATTA
 AGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTATGTCTGGTTTAAACAATTTTATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAG
 AAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTTGGGTTTAAATAAGAA TTTTATCTATAGGGTTTTATAAA TTAGCTTTTTTTCATTTATTA
 CACATGCTTTGTTAAGGCATTATTTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTGTTTAAATAGGAAGAT
 TGAGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGGA
 TTTAATTTTAGAAAAGTTCCTTATCTTATATAAAA TTTTTTTCITTTTTTCITTAATTTTTTTCTACGGGATTAAGTGTGGTTATCTTTTCGG
 TTAGTTTATTACAATAACTGGTGATTCTAA TTTTTCATCGTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATTTAAAAAGTATAATAGGA
 TTATTGATTTAAGAAATTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAATTTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTTACCTTATTATTTAAATTTAT
 TAACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCITTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATAA
 TTCATCTTATTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAAT-AT [1099]

C.hominivorax individuo No 7.35

ATCGAATTGGTGATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTTAAATTATGGGAGTTGAAATTATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAA
 ATGATTTTGAAAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCTG
 CTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTCCATTTCTTACTTTAGTAACTGCTGGGGTTTATTTGTTAATTCGGTTTAAATATTGTATTA
 AGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTATTGCTGGTTTAAACAATTTTATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAG
 AAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTTGGGTTTAAATAAGAAATTTTATCTATAGGGTTTTATAAA TTAGCTTTTTTTCATTTATTA
 CGCATGCTTTGTTAAGGCATTATTTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTGTTTAAATAGGAAGAT
 TGAGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTTAGCCGATTTTATTCTAAGGA
 TTTAATTTTAGAAAAGTTCCTTATCTTATATAAAA TTTTTTTCITTTTTTCITTAATTTTTTTCTACGGGATTAAGTGTGGTTATCTTTTCGG
 TTAGTTTATTACAATAACTGGTGATTCTAA TTTTTCATCTTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATTTAAAAAGTATAATAGGA
 TTATTGATTTAAGAAATTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAATTTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTTACCTTATTATTTAAATTTAT
 AACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCITTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATAA
 TCATCTTATTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTTAT [1100]

C.hominivorax individuo No 7.36

AATCGAATTGGTGATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTTAAATTATGGGAGTTGAAATTATA TTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAA
 AATGATTTTGAAAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCT
 GCTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTCCATTTCTTACTTTAGTAACTGCTGGGGTTTATTTGTTAATTCGGTTTAAATATTGTATT
 AAGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTATGTCTGGTTTAAACAATTTTATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAA
 GAAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTTGGGTTTAAATAAGAAATTTTATCTATAGGGTTTTATAAA TTAGCTTTTTTTCATTTATTA
 ACGCATGCTTTGTTAAGGCATTATTTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTGTTTAAATAGGAAGA

TTGAGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTAGCCGGATTTATTCTAAGG
 ATTTAATTTTAAAAAGTTTCTTTATCTTATATAAAATTTTTTCTTTTTCTTTATTTTTTTCTACGGGATTAACGTTTGTTATTCTTTTCG
 GTTAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAATTTTTTCATCTTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATATTAATAAGTATAATAGG
 ATTATTGATTTAAGAAATTTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAAATTTTCTACCCCTATAGTAGTAGTTTTACCTTATTATTTAAATTA
 TTAACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATA
 ATTCATCTTATTTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1101]

C.hominivorax individuo No 7.45

AATCGAATTGGTGATGTGGCATTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATATGGTAGTTCGAAATTATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAA
 AATGATTTTGAATAATAAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCCCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCT
 GCTATAGCGGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTCCATTCTTCTACCTTAGTAACTGCTGGGGTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATT
 AAGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTGTCTGGTTAAACAATATTCATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAA
 GAAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTAATAATAAGAATTTTATCAATAGGGTTTTATAAATTAGCTTTTTTTCATTTATTA
 ACACATGCTTTGTTAAGGCATTATTATTATGTGTGCCGGGGCTATTATTCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTCGTTTAAATGGGAAGA
 TTGAGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGG
 ATTTAATTTTAAAAAGTTTCTTTATCTTATATAAAATTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTACGGGATTAACGTTTGTTATTCTTTTCG
 GTTAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAATTTTTTCATCTTTAAATATATTTAAATGATGAGGGTTGGGTAATATTAATAAGTATAATAGG
 ATTGTTGATTTAAGAAATTTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAAATTTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTTACCTTATTATTTAAATTA
 TTAACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATA
 ATTCATCTTATTTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTA- [1100]

C.hominivorax individuo No 7.46

ATCGATTGGTGATGTGGCATTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATATGGTAGTTGAAATTATATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAAA
 TGATTTTGAATAATAAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCCCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCTGC
 TATAGCGGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTCCATTCTTCTACCTTAGTAACTGCTGGGGTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATTA
 GAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTGTCTGGTTAAACAATATTCATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAGA
 AGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTAATAATAAGAATTTTATCAATAGGGTTTTATAAATTAGCTTTTTTTCATTTATTAAC
 ACATGCTTTGTTAAGGCATTATTATTTATGTGTGCCGGGGCTATTATTCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTCGTTTAAATGGGAAGATT
 GAGTTTAAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGGAT
 TTAATTTTAAAAAGTTTCTTTATCTTATATAAAATTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTACGGGATTAACGTTTGTTATTCTTTTCGGT
 TAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAATTTTTTCATCTTTAAATATATTTAAATGATGAGGGTTGGGTAATATTAATAAGTATAATAGGAT
 TGTTGATTTAAGAAATTTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAAATTTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTTACCTTATTATTTAAATTA
 AACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATAAT
 TCATCTTATTTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1099]

C.hominivorax individuo No 7.55

ATCGAATTGGTGATGTGGCTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATATGGGAGTTGAAATTATATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAA
 ATGATTTTGAATAATAAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTTCTTCTTGATTGCCAGCTG
 CTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTCCATTCTTCTACTTTAGTAACTGCTGGGGTTATTTGTTAATTCGGTTAATATTGTATTA
 AGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTGTCTGGTTAAACAATATTTATAGCCGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAG
 AAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTAATAATAAGAATTTTATCTATAGGGTTTTATAAATTAGCTTTTTTTCATTTATTA

CGCATGCTTTGTTAAGGCATTATTATTTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCATAATATAAAATAATTGTCAGGATATTCGTTAATAGGAAGAT
 TGAGTTTAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTAGCCGGATTTTATTCTAAGGA
 TTTAATTTAGAAATAGTTTCTTATCTTATATAAAATTTTTTCCITTTTTCTTTAATTTTTTCTACGGGATTAACCTGTTTGTTATCTTTTCGG
 TTAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAAATTTTCATCTTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATATTAAGGATAAATAGGA
 TTATTGATTTAAGAATTTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAATTTTCCACCCCTATAGTAGTAGTTTACCTTATTATTTAAATTTATT
 AACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAATAATTATAAT
 TCATCTTATTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCCTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1100]

C.hominivorax individuo No 7.56

ATCGAATTGGTGATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTTAAATATGGGAGTTGAAATTATATTTTTATTAGAAGTGATAAAAA
 ATGATTTTGAAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTCTTCTTGATTGCCAGCTG
 CTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTCCATTTCTTACTTTAGTAAGTCTGCTGGGGTTTATTTGTTAATTCGGTTAATATTGTATTA
 AGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTGTCTGGTTTAAACAATTTTATAGCCGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAG
 AAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTAATAATAAGAATTTTATCTATAGGGTTTATAAAATTAGCTTTTTTTCATTTATTAA
 CGCATGCTTTGTTAAGGCATTATTATTTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCATAATATAAAATAATTGTCAGGATATTCGTTAATAGGAAGAT
 TGAGTTTAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTAGCCGGATTTTATTCTAAGGA
 TTTAATTTAGAAATAGTTTCTTATCTTATATAAAATTTTTTCCITTTTTCTTTAATTTTTTCTACGGGATTAACCTGTTTGTTAATCTTTTCGG
 TTAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAAATTTTCATCTTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATATTAAGGATAAATAGGA
 TTATTGATTTAAGAATTTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAATTTTCCACCCCTATAGTAGTAGTTTACCTTATTATTTAAATTTATT
 AACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAATAATTATAAT
 TCATCTTATTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCCTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1100]

C.hominivorax individuo No 7.65

ATCGAATTGGTGATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTTAAATATGGGAGTTGAAATTATATTTTTATTAGAAGTGATAAAAA
 ATGATTTTGAAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTCTTCTTGATTGCCAGCTG
 CTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTTCATTTCTTACTTTAGTAAGTCTGCTGGGGTTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATTA
 AGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTGTCTGGTTTAAACAATTTTATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAAG
 AAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTAATAATAAGAAITTTATCTATAGGGTTTATAAAATTAGCTTTTTTTCATTTATTAA
 CACATGCTTTGTTAAGGCATTATTATTTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCATAATATAAAATAATTGTCAGGATATTCGTTAATAGGAAGAT
 TGAGTTTAATAATACCATTAACCTTCTTCTGTTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCTTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGGA
 TTTAATTTAGAAATAGTTTCTTATCTTATATAAAATTTTTTCTTTTTTCTTTAATTTTTTCTACGGGATTAACCTGTTTGTTAATCTTTTCGG
 TTAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAAATTTTCATCGTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATATTAAGGATAAATAGGA
 TTATTGATTTAAGAATTTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAATTTTCCACCCCTATAGTAGTAGTTTACCTTATTATTTAAATTTATT
 TAACAATATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGGTAATAGGTTATTTAATTTCTAATGTTTCTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAATAATTATAA
 TTCATCTTATTTTTAGGTTCAATATGATTTATACCCTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1100]

C.hominivorax individuo No 7.66

AATCGAATTGGTGATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTTAAATATGGGAGTTGAAATTATATTTTTATTAGAAGTGATAAAAA
 AATGATTTTGAAATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAAGAGAGCTCAGATTCCATTTCTTCTTGATTGCCAGCT
 GCTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCAGCTTTAGTTCATTTCTTACTTTAGTAAGTCTGCTGGGGTTTATTTATTAATTCGATTTAATATTGTATT
 AAGAAGTTCATGAATAGGAAATTTATTATTATTGTCTGGTTTAAACAATTTTATAGCTGGGTTAGGGGCTAATTATGAATTTGATTTAAA

JAAGATTATTGCTTTATCTACTTTAAGACAATTGGGTTTAATAATAAGAATTTTATCTATAGGGTTTTATAAATTAGCTTTTTTTCATTTATTA
 ACACATGCTTTGTTAAGGCATTATTTATGTGTGCCGGAGCTATTATCCATAATATAAATAAATTGTCAGGATATTCGTTTAAATAGGAAGA
 TTGAGTTAATAATACCATTAACCTCTTCTTGTTTAATGTAGCTAATTTAGCATTATGTGGAATACCCTTTTTAGCTGGATTTTATTCTAAGG
 ATTTAATTTAGAAAATAGTTTCTTATCTTATATAAAATTTTTTCTTTTTTCTTTAATTTTTTCTACGGGATTAACGTGGTTATTCTTTTCG
 GTTAGTTTATTATACAATAACTGGTGATTCTAATTTTCATCGTTAAATATATTTAAATGATGAAGGTTGGGTAATATTAATAAAGTATAAATAGG
 ATTAATTGATTTAAGAAATTTTGGGGGAAGTATATTAAGTTGATTAATTTCCCTACCCCTATAGTAGTAGTTTTACCTTATTATTTAAATTA
 ITAACAAATTTGTTTGTATTGTAGGAGGGTAATAGGTTAATTTAATTTCTAATGTTTCTTTGTTTTTTATAATAAGGCTTTAAATAATTATA
 ATTCATCTTATTTTTAGGTTCAATATGATTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1101]

*Chrysomya putoria*_NADH5 (GenBank) -

ATCGAATTGGAGATGTTGCTTTATTATTAGCTATTGCATGAATATTAATTATGGAAGTTGAAATTATATTTTTATTTAGAAGTAATAAAGA
 ATGATTTTGAAATGATAATTGTAGGTAGTTAGTTATATTAGCAGCTATGACAAAGAGAGCTCAAATTCCTTTTTCTTCATGATTACCTGCTG
 CTATAGCAGCTCCTACTCCTGTTTCTGCTTTAGTTCACTCATCAACTCTAGTAACAGCAGGAGTTATTTAATTCGATTTAATATTTTATT
 AAGTAGTTTCATGAATGGGTAATTTATTAATTATTATTATCTGGTTAACAATATTTATGGCTGGTTTAGGTGCTAATTATGAATTTGATTTGAAG
 AAGATTATTGCTTTATCAACTTTAAGTCAGTTAGGTTTAATAATAAGAATTTATCAATAGGGTATTATAAGTTAGCTTTTTTTCATCTTCTTA
 CTCATGCTTTATTTAAGGCTTTATTATTTATATGTGCTGGAGCTATTATTCATAATATAAATAAATTGTCAAGATATTCGTTAATGGGGAGATT
 AAGTTTAATAATACCTCTTACTTCTTCTTGTTTAATGTTGCTAATTTGGCTTTATGTGGTATACCTTTTTAGCTGGATTTTATTCAAAGGATT
 TAATTTAGAACTGTTTCTTATCTTATATTAATATGTTTTCTTTCTTTTTATATTTTTTTCTACGGGGTTAACTGTTTGTATTCTTTTCGTTT
 AGTTTATTAACAATGACTGGTGATTCAAAATTTTCTTCATTAATAATATTAATAATGATGAGGGTTGAGTTATATTAATAAAGTATAAATAGGATT
 ATTGATTTAAGAATTTTTGGAGGGAGTATGTTAAGTTGATTAATTTTTCTACTCCAGTAGTGGTTGTTCTTCTTCTTATTTAAGTTATTA
 ACATTATTTGTTTGTATTGTAGGAGGAGTAAGTGGTTATATAATTTCTAATGTATCATTATTTTTTACAATAAGGCTTTAAATAATTATCATT
 CTCTTATTTTTAGGTTCAATGTGATTTATACCTTATATTTCTACTTATGGTATTATTAATTAT [1100]

REGION NADH4- NADH5 mt ADN (primer 8)

C. hominivorax individuo No 8.5

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTATTAAGATCAGCAAATATGGCTGCTCCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGCTTTGTTATCTTTTTTAGAGCTGCTTATACTTTATATTATA
 TGCATATAGTCAACATGGGAAAAATTTTTCAGGAACCTTATTCATTTAGAGGGGGGTCAGTTTCGAGAGTTTTACTTTTATTTTACATTGGTTT
 CCTTTAAATTTAATTTTAAAGGGGGATATGTGTATATTGTGATTATTTAAATAGTTAATTAATAAATTGATTTGTGGTCAATGATA
 AGAAAATTTTCTTTTAAATCGTGAAATTTTATCAATTTGTACAATTAGATTTATAAGTTATTTTTTTTTAGATTAATTTCTTTTTAATAGG
 TATAATTTTATTATAAATGATTATAGAATTTTTATTGAATGGGAAGTTGTTTCAATGAATTCGATAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGAT
 TGAATAAGATTAATTTTATATCTTTTGTTTAATAAATTTCTTCTTTGGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAATTA
 ATCGTTTCATTATATTGGTATTAATTTGTTACTTCTATAATGTTATTAATTATTAGTCCTAATTTAATTAGAATTTTGTAGGATGAGATGG
 ATTAGGTCTCGTTTCTTATTGTTTGTATTATTTTCAAAAATGTAATAATCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATTGGT
 GATGTGGCATTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATTTATGGTAGTTGAAATTTATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAAATGATTTTGA
 ATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACCAA

C.hominivorax individuo No 8.6

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTATTAAGATCAGCAAATATGGCTGCTCCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGCTTTGTTATCTTTTTIAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATA
 TGCATATAGTCAACATGGGAAAATTTTTTCAGGAACCTATTCATTTAGAGGGGGGTCAGTTCGAGAGTTTTACTTTTATTTTTACATTGGTTT
 CCTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGGGATATGTGTATATTGTGATTATATTTAAATAGTTTAAATTAATAATTTGATTTGTGGTGTCAATGATA
 AGAAATTTTTCTTTTTAAATCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTATAAGTTTATTTTTTTIAGATTAATTTCTTTTTTAAATAGG
 TATAATTTTATTATAAATGATTATAGAATTTTTATTGAATGGGAAGTTGTTTCAATGAATTCGATAAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGAT
 TGAATAAGATTAATTTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTGGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAAATTA
 ATCGTTTCATTATAATTGGTATTAATTTTGTACTTCTATAATGTTATTAATTTATTAGTCCTAATTTAATTAAGAAATTTTGTAGGATGAGATGG
 ATTAGGTCTCGTTTCTTATTGTTTAGTTATTTATTTTCAAAATGTAAGTCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATGGT
 GATGTGGCATTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATTTAGGTAGTTGAAATTTATTTTTTATTTAGAAAGTGATAAAAAATGATTTTGAA
 ATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAA

C.macellaria individuo No 8.15

GAATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGATTTTTATTAAGATCAGCTAATATGGCTGCTCCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAAATTGTTAGATGATCTTGAGTTTCTATATTTATGTTATCTTTATTTATCTTTTTIAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATA
 TGCTTATAGTCAACATGGAAAGATTTTTTCAGGAGCTTATTCATTTAGAGGAGGATCAGTTCGAGAAATTTTACTTTTATTTTTACATTGATTT
 CCTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGGAGATATGTGTATATTATGATTATGTTTAAATAGTTTAAATTAATAATTTGATTTGTGGTGTCAATGATA
 AGAAGTTTTCTTTTTAAACCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTGTAAGTTTATTTTTTTIAGTTTATCTTCTTTTTTAAATAGGA
 ATGATTTTTTATTATGAATGATTATAGAATTTTTATTGAATGAGAAGTAGTGCTATAAAATCAATAAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGATT
 GAATAAGATTAATTTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTAGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAGATCAA
 TCGATTTATTATATTGGTGTGATATTGTTACTTCAATGATATTATTAATTATTAGTCCTAATTTAATCAGTATTTTATTAGGATGAGATGGA
 TTAGGACTTGTATCTTATTGTTTAGTTATTTATTTTCAAAATGTAAGTCTTATAATGCTGGTATATTAAGTGCATTATCTAATCGAATGGAG
 ATGTAGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATTTATGGAAGTTGAAATTTATTTTTTATTTAGAAAGTAATGAAGAATGATTTTGAAAT
 AATAATTGTAGGAAGATTAGTAATGTTAGCTGCAATAACTAA

C.macellaria individuo No 8.16

GAATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGATTTTTATTAAGATCAGCTAATATGGCTGCTCCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAAATTGTTAGATGATCTTGAGTTTCTATATTTATGTTATCTTTATTTATCTTTTTIAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATA
 TGCTTATAGTCAACATGGAAAGATTTTTTCAGGAGCTTATTCATTTAGAGGAGGATCAGTTCGAGAAATTTTACTTTTATTTTTACATTGATTT
 CCTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGGAGATATGTGTATATTATGATTATGTTTAAATAGTTTAAATTAATAATTTGATTTGTGGTGTCAATGATA
 AGAAGTTTTCTTTTTAAACCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTGTAAGTTTATTTTTTTIAGTTTATCTTCTTTTTTAAATAGGA
 ATGATTTTTTATTATGAATGATTATAGAATTTTTATTGAATGAGAAGTAGTGCTATAAAATCAATAAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGATT
 GAATAAGATTAATTTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTAGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAGATCAA
 TCGATTTATTATATTGGTGTGATATTGTTACTTCAATGATATTATTAATTATTAGTCCTAATTTAATAGTATTTTATTAGGATGAGATGGA
 TTAGGACTTGTATCTTATTGTTTAGTTATTTATTTTCAAAATGTAAGTCTTATAATGCTGGTATATTAAGTGCATTATCTAATCGAATGGAG
 ATGTAGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATTTATGGAAGTTGAAATTTATTTTTTATTTAGAAAGTAATGAAGAATGATTTTGAAAT
 AATAATTGTAGGAAGATTAGTAATGTTAGCTGCAATAACTAA

C.hominivorax individuo No 8.36

AGCTCTCTTAGTTATTGCAGCTAATATTACTAATATACCAATAATTATTATTTCAAATCATTTTTTATCACTTCTAAATAAAAAATATAATTT
 CAACTCCCATAATTTAATATTCAAGCAATAGCTAATAATAAAGCCACATCACCAATTCGATTTGACAACGCAGTCAATATACCAGCATTATA
 AGATTTTACATTTTGAAAATAAATACTAAACAATAAGAAACGAGACCTAATCCATCTCATCCTAACAAAATTCTAATTAATAGGACTAA
 TAATTAATAACATTATAGAAGTAACAAATATTAATACCAATATAATGAAACGATTAATTTATAATCACTTTCTATATATTCCTTTCTATAAA
 AAATAACCAAAGAAGAAATTATTAACAAAAGATATAAAAAATTAATCTTATTCAATCTAATAATAAAGTTATAACAATATTTATTGAATTC
 ATTGAAACAACCTCCCATTCATAAAAAATTCTATAATCATTATAATAAAAAATTATACCTATTAAAAAAGAACTAATCTAAAAAAAATAA
 ACTTATAAATCTAATTGTACAAATTGATAAATATTTACGATTTAAAAAGAAAAATTTCTTATCATTGACACCACAAATCAATATTTTAATTA
 AACTATTTAAATATAATCACAAATATACACATATCTCCCTTTAAAAATTAATAAATTTAAAGGAAACCAATGTAAAAATAAAGTAAAAACTCT
 CGAACTGACCCCCCTCTAAATGAATAAGTTCTGAAAAAATTTCCCATGTTGACTATATGCATATAAATATAAAGTATAAGCAGCTCTAAA
 AAAAGATAACAAAGACAACATAAATATAGAAATTCAGATCATCTAACAATTCTATTAATTAAGAAATTTCTCCTAATAAATTTAATGTAG
 GAGGAGCAGCCATATTTGCTGATCTTAATAAAAAACCATCATAATGCTATTGAAGGTATAAAATTTAATATTTCCC

C.hominivorax individuo No 8.45

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTATTAAGATCAGCAAATATGGCTGCTCCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGCTTTTGTATCTTTTTTAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATA
 TGCATATAGTCAACATGGGAAAAATTTTTCAGGAACCTATTCAATTTAGAGGGGGGTCAGTTGAGAGTTTTACTTTTATTTTACATTGGYTT
 CCTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGGGATATGTGTATATTTGATTATATTTAAATAGTTAATTAATAATTTGATTGTGGTGCAATGATA
 AGAAATTTTCTTTTAAATCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTATAAGTTAATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTAAAGG
 TATAATTTTATTATAAATGATTATAGAAATTTTATTGAATGGGAAGTTGTTCAATGAATTCGATAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGAT
 TGAATAAGATTAATTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAAATTA
 ATCGTTTCATTATATTGGTATTAATATTGTTACTTCTATAATGTTATTAATTTATTAGTCTAAATTAATTAGAATTTTGTAGGATGAGATGG
 ATTAGGTCTCGTTTCTTATTGTTAGTTATTTATTTCAAATGTAAATCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATTGGT
 GATGTGGCATTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATTTAGGTAGTTGAAATTTATTTTTATTAGAAGTGATAAAAAATGATTTTGAA
 ATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAA

C.hominivorax individuo No 8.46

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTATTAAGATCAGCAAATATGGCTGCTCCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TCTTTAATTAATAGAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGCTTTTGTATCTTTTTTAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATAT
 GCATATAGTCAACATGGGAAAAATTTTTCAGGAACCTATTCAATTTAGAGGGGGGTCAGTTGAGAGTTTTACTTTTATTTTACATTGGTTTC
 CTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGGGATATGTGTATATTGTGATTATATTTAAATAGTTAATTAATAAATATTGATTGTGGTGCAATGATAA
 GAAATTTTCTTTTAAATCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTATAAGTTAATTTTTTTTATTTTATTTTAAATAGGT
 ATAATTTTATTATAAATGATTATAGAAATTTTATTGAATGGGAAGTTGTTCAATGAATTCGATAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGATT
 GAATAAGATTAATTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTGGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAAATTA
 TCGTTTCATTATATTGGTATTAATATTGTTACTTCTATAATGTTATTAATTTATTAGTCTAAATTAATTAAGAATTTTGTAGGATGAGATGGAT
 TAGGTCTCGTTTCTTATTGTTAGTTATTTATTTCAAATGTAAATCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATTGGTGA
 TGTGGCATTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATTTAGGTAGTTGAAATTTATTTTTATTAGAAGTGATAAAAAATGATTTTGAAATA
 ATAATTTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAA

C.hominivorax individuo No 8.55

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTTATTAAGATCAGCAAATATGGCTGCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TCTTTAATTAATAGAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGTCTTTGTTATCTTTTTTAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATAT
 GCATATAGTCAACATGGGAAAATTTTTTCAGGAACCTTATTCATTTAGAGGGGGGTCAGTTCGAGAGTTTTACTTTTATTTTTACATTGGTTTC
 CTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGAGATATGTGTATATTGTGATTATATTTAAATAGTTTAAATTAATTAATTTGATTTGTGGTGTCAATGATAA
 GAAATTTTTCTTTTTAAATCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTATAAGTTTATTTTTTTTTAGATTAGTTTCITTTTTAATAGGT
 ATAATTTTTATTATAAATGATTATAGAAITTTTTATTGAATGGGAAGTTGTTCAATGAATTCATAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGATT
 GAATAAGATTAATTTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTGGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAAATTA
 TCGTTTCATTATTTGGTATTAATATTTGTTACTTCTATAATGTTATTAATTATTAGTCCATAATTTAATTAGAATTTTGTAGGATGAGATGGAT
 TAGGTCTCGTTTCTTATTGTTTAGTTATTTATTTTCAAAAATGTA AAAATCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATTGGTGA
 TGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTA AATATGGGAGTTGAAATTAATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAAATGATTTTGAAATA
 ATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAA

C.hominivorax individuo No 8.56

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTTATTAAGATCAGCAAATATGGCTGCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGTCTTTGTTATCTTTTTTAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATA
 TGCATATAGTCAACATGGGAAAATTTTTTCAGGAACCTTATTCATTTAGAGGGGGGTCAGTTCGAGAGTTTTACTTTTATTTTTACATTGGTTT
 CCTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGAGATATGTGTATATTGTGATTATATTTAAATAGTTTAAATTAATTAATTTGATTTGTGGTGTCAATGATA
 AGAAATTTTTCTTTTTAAATCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTATAAGTTTATTTTTTTTTAGATTAGTTTCITTTTTAATAGG
 TATAATTTTTATTATAAATGATTATAGAATTTTTATTGAATGGGAAGTTGTTCAATGAATTCATAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGAT
 TGAATAAGATTAATTTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTGGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAAATTA
 ATCGTTTCATTATATTGGTATTAATATTTGTTACTTCTATAATGTTATTAATTATTAGTCCATAATTTAATTAGAATTTTGTAGGATGAGATGG
 ATTAGGTCTCGTTTCTTATTGTTTAGTTATTTATTTTCAAAAATGTA AAAATCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATTGGT
 GATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTA AATATGGGAGTTGAAATTAATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAAATGATTTTGAA
 ATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAA

C.hominivorax individuo No 8.65

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTTATTAAGATCAGCAAATATGGCTGCTCCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGTCTTTGTTATCTTTTTTAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATA
 TGCATATAGTCAACATGGGAAAATTTTTTCAGGAACCTTATTCATTTAGAGGGGGGTCAGTTCGAGAGTTTTACTTTTATTTTTACATTGGTTT
 CCTTTAAATTTATTAATTTTAAAGGGGGATATGTGTATATTGTGATTATATTTAAATAGTTTAAATTAATTAATTTGATTTGTGGTGTCAATGATA
 AGAAATTTTTCTTTTTAAATCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTATAAGTTTATTTTTTTTTAGATTAGTTTCITTTTTAATAGG
 TATAATTTTTATTATAAATGATTATAGAATTTTTATTGAATGGGAAGTTGTTTCAATGAATTCATAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGAT
 TGAATAAGATTAATTTTTATATCTTTTGTTTAATAATTTCTTCTTTGGTTATTTTTATAGAAAGGAATATATAGAAAGTGATTATAAAATTA
 ATCGTTTCATTATATTGGTATTAATATTTGTTACTTCTATAATGTTATTAATTATTAGTCCATAATTTAATTAGAAITTTGTTAGGATGAGATGG
 ATTAGGTCTCGTTTCTTATTGTTTAGTTATTTATTTTCAAAAATGTA AAAATCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATTGGT
 GATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTA AATATGGGAGTTGAAATTAATTTTTTATTTAGAAGTGATAAAAAATGATTTTGAA
 ATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAA

C. hominivorax individuo No 8.66

TATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGATGGTTTTATTAAGATCAGCAAAATGCGCTGCTCCTCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAATTGTTAGATGATCTTGAATTTCTATATTTATGTTGCTTTGTTATCTTTTTTITAGAGCTGCTTATACTTTATATTTATA
 TGCATATAGTCAACATGGGAAAATTTTTTCAGGAACCTATTCATTTAGAGGGGGGTCAGTTCGAGAGTTTTACTTTTTATTTTACATTGGTTT
 CCTTTAAATTTAATTTTTAAAGGGGGATATGTGTATATTGTGATTATATTTAAATAGTTTAAATFAAAATATTGATTTGTGGTGTCAATGATA
 AGAAATTTTTCTTTTTAAATCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTATAAGTTATTTTTTTTTITAGATTAGTTTCITTTTTAATAGG
 TATAATTTTTATTATAAATGATTATAGAATTTTTATTGAAATGGGAAGTTGTTCAATGAATCAATAAAATATTGTTATAACTTTATTATTAGAT
 TGAATAAGATTAATTTTTATATCTTTTGTTTTAAATAATTCCTCTTTGGTTATTTTTTATAGAAAAGGAATATATAGAAAAGTGATTATAAAATTA
 ATCGTTTCATTATATTGGTATTAATATTGTTACTTCTATAATGTTATTAATTAATTAGTCCTAATTTAATTAGAATTTTGTAGGATGAGATGG
 ATTAGGTCTCGTTTCTATTGTTAGTTATTTATTTTCAAAATGTAATCTTATAATGCTGGTATATTGACTGCGTTGTCAAATCGAATTGGT
 GATGTGGCTTTATTATTAGCTATTGCTTGAATATTAATTTATGGGAGTTGAAATTAATTTTTTATTAGAAAGTGATAAAAAATGATTTTGAA
 ATAATAATTATTGGTATATTAGTAATATTAGCTGCAATAACTAA

Chrysomya putoria NADH4/ NADH5 (GenBank)

TATTGAATTTTATACCTTCTATAGCATTATGATGATTTTTATTAAGTTTCAGCTAATATGGCTGCTCCTCTACATTAATTTATTAGGAGAAAT
 TTCTTTAATTAATAGAATTGTTAGTTGATCTTGAGTTTCTATATTAATATTAATCTTTATTATCATTTTTTAGAGCTGCATATACTTTATATTTAT
 ATGCATATAGTCAACATGGAAAGATTTTTCTGGAGCTTACTCATTAGAGGAGGTTTCAGTTCGAGAAATTTTTACTTTAATTTTACATTGATT
 TCCTTTAAATTTATTAATTTTTAAAGGGTGATATGTGTATATTAATGATTATGTTTAAATAGTTTAAATAAAATATTGATTTGTGGTGTCAATGAT
 AAGAAGTTTTCTTTTTAAACCGTGAAATATTTATCAATTTGTACAATTAGATTTGTAAGTTTATTTTTTTAGTTTATCATCTTTTTTGATAGG
 GATAATTTTTATTATAAATGATTATAGAATTTTTATTGAGTGAGAAGTTGTTCTATAAAATCAATAAAATATTGTTATGACTTTATTATTAGAT
 TGAATAAGTTTAAATTTTATATCATTGTTTTAATAATTTCTTCAATGGTTATTTTTTACAGAAAGGAATATATAGAAAAGTGATTATAAAATTA
 ATCGATTTATTATATTAGTTTTAATTTTGTACATCAATAATATTATTAATTAATTAGTCCTAATTTAATTAGTATTTTATTAGGATGAGATGG
 TTTGGGACTTGTGCTTATTGTTAGTAATTTATTTCCAAAATGTTAAGTCTTATAATGCAGGGATTAATACTGCTTATCTAATCGAATTGGA
 GATGTTGCTTTATTATTAGCTATTGCATGAATATTAATTTATGGAAGTTGAAATTAATTTTTTATTAGAAAGTAATAAAGAATGATTTTGAA
 ATGATAATTGTAGGTAGTTTAGTTATATTAGCAGCTATGACAAA

REGION NADH4 mtADN (primer 9)*C. hominivorax* individuo No 9.5

ATGTTAAAAATTAATTATTAGAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATAATAACTTATTGAATGGTTCAGAGTTTTTTATTTTTATTAAG
 TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATATATAGAAATTTTATAAGAATTTCTTATTTATTTGGGTGTGATATGATTTTCATATGGATTAATTTTGT
 TAAGTTTATGAATTAATTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTTTATTAAATATTATTTT
 ATTATTAATTTTTGTTAGTTCTTACTTTTTAGAAGAATGAGATTATTTATGTTTTATTTATTTTTTGAAGAAGCTTAATTCCTACTTTATTTTTGA
 TTTTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTAT
 TTTTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTAATAAATTTTATTTTAAATTTATGAATTATTATTTTTCTTTAGTTATAGC
 TTTTTAGTAAAAATACCGATATTTTGGTTCAATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTCTGGATCTATAATTTTAGCAGGA
 ATTATGTTGAAGTTGGGGGTTATGGATTATTACGGGTTTTTCCAATTTTACAATTAATAGGTTTAAAAATTAATTTTATTTGGGTTAGAATTA
 GATTAGTAGGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAACTGATTTAAAGGCTTTAATTGCTTATTTCTTCTGTAGCTCATATAGGAA
 TTGTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAATTTGTGGTTCATATACACTAATAATTGCTCATGGATTGTGTTCTCCGGATTATT
 TTGTTTAGCAAAATTTCTTATGAACGGATGGGGAGTCTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATG
 A-

C.hominivorax individuo No 9.6

ATGTTAAAAATTATTATTACAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATATAACTTATTGAATGGTTCAGAGTTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATATATAGAAATTTTTATAAGAATTTCTTATTTATTTGGGTGTGATATGATTTTCATATGGATTAATTTTTGT
TAAGTTTATGAATTATTTCTTTAATAATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAA TTATATAAATTTATTTTTATTAATATTATTTT
ATTATTAATTTTGTAGTTCTTACTTTTAGAAGAATGAGATTATTATGTTTTATTTATTTTTGAAAGAAGCTTAA TTCCTACTTTATTTTTGAT
TTTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTTGTTTTATACATTATTGGTTCTTTACCAATGTTAATTGGTATT
TTTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAAATTTTTATTTATTAATAAATTTTATTTAATTA TGAA TTATTATTTTTCTTTAGTTATAGCT
TTTTAGTAAAAATACCGATATTTTTGGTTCATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTTAGCAGGAA
TTATGTTGAAGTTGGGGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTACAATTAATAGGTTTAAAA TTTAATTTTTATTTGGGTTAGAATTAG
ATTAGTAGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAAACTGATTTAAAGGCTTTAA TTGCTTATTCCTCTGTAGCTCATATAGGAAT
TGTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAATTTGTGGTTCATATACACTAATAA TTGCTCATGGATTGTGTTCTCCGGATTATTT
TGTTTAGCAAATATTTCTTATGAACGGATGGAAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGAT

C.macellaria individuo No 9.15

ATGTTAAAAATTATTATTAGAATTTTATTTTTATTTCCATTATGTTTAAATACATAA TACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTATTTAATAAATATGTATAGAAATTTTTATAAGAATTTCTTATTTGTTGGATGTGATATAATTTCTTATGGATTAATTTTTGT
TAAGTTTATGAATTGTTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAATCAGTTTATAAGTATAATAA TTATACAAATTTATTTTTATTAATATTGTTTT
ATTATTAATTTTGTAGTACTTACTTTTAGAAGTATAAGATTGTTTATGTTTTATTTATTTTTGAAAGTAGTTTAA TTCCACTTTATTTTTAA
TTTTAGGTTGAGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCAGGAGTTTATTTATTTATTTTATACTTTATTAGTATCTTTACCTATATTAATTGGTAT
TTTTATTTATATAAGTCTACTGGTACTTTAAAATTTTTATTTATTAATAA TTATATATTTAATTATGAGTTATTGTA TTTTTCTTTAGTAATGG
CTTTTTAGTAAAAATACCTATGTTTTAGTTCATTTATGATTACCTAAGGCTCATGTAGAAGCTCCTGTTTCAGGATCTATAATTTTAGCTGG
AATTATATTAAGTTAGGAGTTATGGATTATTACGAGTATTTCTTTTTTACAATTAATAGGATTGAAATTC AATTTTTATTTGAATTAGTATT
AGATTAGTAGGAGGAGTATTGGTTAGTTAATTTGTTTACGACAAACTGATTTAAAGGCTTTAATTGCTTATTCATCAGTAGCTCATATAGGA
ATTGTTTTAGCTGGATTAATAACTTTAACATATATAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAA TTGCTCATGGATTATGTTCTTCTGGATTAT
TTTTGTTAGCTAATATTTCTTATGAACGAATAGGAAGTCGTAGTTTATTAATTAATAAGGGGATATTAATTTTTATACCT-
CAATAGCATTATGAT

C.macellaria individuo No 9.16

ATGTTAAAAATTATTATTAGAATTTTATTTTTATTTCCATTATGTTTAAATACATAA TACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTATTTAATAAATATGTATAGAAATTTTTATAAGAATTTCTTATTTGTTGGATGTGATATAATTTCTTATGGATTAATTTTTGT
TAAGTTTATGAATTGTTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAATCAGTTTATAAGTATAATAA TTATACAAATTTATTTTTATTAATATTGTTTT
ATTATTAATTTTGTAGTACTTACTTTTAGAAGTATAAGATTGTTTATGTTTTATTTATTTTTGAAAGTAGTTTAA TTCCACTTTATTTTTAA
TTTTAGGTTGAGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCAGGAGTTTATTTATTTATTTTACTTTATTAGTATCTTTACCTATATTAATTGGTAT
TTTTATTTATATAAGTCTACTGGTACTTTAAAATTTTTATTTACTAAATAATTATATATTTAATTATGAGTTATTGTA TTTTTCTTTAGTAATGG
CTTTTTAGTAAAAATACCTATGTTTTAGTTCATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAAGCTCCTGTTTCAGGATCTATAATTTTAGCTGG
AATTATATTAAGTTAGGAGTTATGGATTATTACGAGTATTTCTTTTTTACAATTAATAGGATTGAAATTC AATTTTTATTTGAATTAGTATT
AGATTAGTAGGAGGAGTATTGGTTAGTTAATTTGTTTACGACAAACTGATTTAAAGGCTTTAATTGCTTATTCATCAGTAGCTCATATAGGA
ATTGTTTTAGCTGGATTAATAACTTTAACATATATAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAA TTGCTCATGGATTATGTTCTTCTGGATTAT
TTTTGTTAGCTAATATTTCTTATGAACGAATAGGAAGTCGTAGTTTATTAATTAATAAGGGGATATTAATTTTTATACCT-
CAATAGCATTATGAT

C.hominivorax individuo No 9.25

ATGTTAAAAATTATTATTAGAAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATAATACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATGTATAGAAATTTTTATAAGAAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATAATTCATATGGATTAATTTTGT
TAAGTTTGTGAATTAATTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTCTATTAATATTATTTT
GTTATTAATTTTGTAGTTCTTACTTTTAGAAGAATGAGATTATTTATGTTTTATTTATTTTTTGAAGAAGTTTAATTCCTACTTTAATTTTGA
TTTTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTAT
TTTTIATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTAATAAATTTTATATTTAATTATGAATTATTATTTTTCTTTAGTTATAGC
TTTTTGTAGTAAAAATACCAATATTTTTGGTTTCATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTTAGCGGGA
ATTATGTTGAAGTTGGGAGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTTACAATTAATAGGTTTAAAAATTAATTTTATTTGGGTTAGAATTA
GATTAGTAGGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAACTGATTTAAAGGCTTTAATTGCTTATTCCTCTGTAGCTCATATAGGAA
TTGTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAAATTTGTGGTTCATATACATTAATAATGCTCATGGATTGTGTTCTTCCGGATTATT
TTGTTTAGCAAAATATTTCTTATGAACGGATGGGGAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATG
AT

C.hominivorax individuo No 9.26

ATGTTAAAAATTATTATTAGAAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATAATACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATGTATAGAAATTTTTATAAGAAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATAAATTCATATGGATTAATTTTGT
TAAGTTTGTGAATTAATTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTCTATTAATATTATTTT
GTTATTAATTTTGTAGTTCTTACTTTTAGAAGAATGAGATTATTTATGTTTTATTTATTTTTTGAAGAAGTTTAATTCCTACTTTAATTTTGA
TTTTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTAT
TTTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTAATAAATTTTATATTTAATTATGAATTATTATTTTTCTTTAGTTATAGC
TTTTTGTAGTAAAAATACCAATATTTTTGGTTTCATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTTAGCGGGA
ATTATGTTGAAGTTGGGAGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTTACAATTAATAGGTTTAAAAATTAATTTTATTTGGGTTAGAATTA
GATTAGTAGGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGCCAACTGATTTAAAGGCTTTAATTGCTTATTCCTCTGTAGCTCATATAGGAA
TTGTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATACAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAAATTGCTCATGGATTGTGTTCTTCCGGATTATT
TTGTTTAGCAAAATATTTCTTACGAACGGATGGGGAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATG
AT

C.hominivorax individuo No 9.35

ATGTTAAAAAGTTATTATTAGAAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATAATACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATGTATAGAAATTTTTATAAGAAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATGATTTTCATATGGATTAATTTTGT
AAGTTTGTGAATTAATTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTCTATTAATATTATTTTGT
TTATTAATTTTGTAGTTCTTACTTTTAGAAGAATGAGATTATTTATGTTTTATTTATTTTTTGAAGAAGTTTAATTCCTACTTTAATTTTGA
TTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTATTT
TTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTAATAAATTTTATATTTAATTATGAATTATTATAITTTCTTTAGTTATAGCTT
TTTTAGTAAAAATACCAATATTTTTGGTTCAATTTATGATTACCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTTAGCAGGAAT
TATGTTGAAGTTGGGAGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTTACAATTAATAGGTTTAAAAATTAATTTTATTTGGGTTAGAATTAGA
TTAGTAGGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAACTGATTTAAAGGCTTTAATCGCTTATTCCTCTGTAGCTCATATAGGAAT
GTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAAATTGCTCATGGATTGTGTTCTTCCGGATTATT
GTTTAGCAAAATATTTCTTATGAACGGATGGGGAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGAT

C.hominivorax individuo No 9.55

ATGTTAAAAGTTATTATTAGAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATATAATACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATGTATAGAAATTTTATAAGAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATGATTTTCATATGGATTAATTTTTGT
TAAGTTTGTGAATTATTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTCTATTAATATTATTT
GTTATTAATTTTGTTAGTTCCTACTTTTAGAAGAATGAGATTTTATGTTTTATTTATTTTTGAAAGAAGTTTAATTCCTACTTTATTTTTGA
TTTTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTAT
TTTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTAATAATTTTATATTTAATTATGAATTATTATATTTTCTTTAGTTATAGC
TTTTTAGTAAAAATACCAATATTTTTGGTTCAATTTATGATTACCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTAGCAGGA
ATTATGTTGAAGTTGGGAGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTTACAATTAATAGGTTTAAAAATTTAATTTTTATTTGGGTTAGAATTA
GATTAGTAGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAACTGATTTAAAGGCTTTAATCGCTTATTCTTCTGTAGCTCATATAGGAA
TTGTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAATGCTCATGGATTGTGTTCTTCTGGATTATT
TTGTTTAGCAAATATTTCTTATGAACGGATGGGGAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTTATACCTTCAATAGCATTATG
AT

C.hominivorax individuo No 9.56

ATGTTAAAAGTTATTATTAGAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATATAATACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATGTATAGAAATTTTATAAGAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATGATTTTCATATGGATTAATTTTTGT
TAAGTTTGTGAATTATTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTCTATTAATATTATTT
GTTATTAATTTTGTTAGTTCCTACTTTTAGAAGAATGAGATTATTTATGTTTTATTTATTTTTGAAAGAAGTTTAATTCCTACTTTATTTTTGA
TTTTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTAT
TTTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTAATAATTTTATATTTAATTATGAATTATTATATTTTCTTTAGTTATAGC
TTTTTAGTAAAAATACCAATATTTTTGGTTCAATTTATGATTACCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTAGCAGGA
ATTATGTTGAAGTTGGGAGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTTACAATTAATAGGTTTAAAAATTTAATTTTTATTTGGGTTAGAATTA
GATTAGTAGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAACTGATTTAAAGGCTTTAATCGCTTATTCTTCTGTAGCTCATATAGGAA
TTGTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAATGCTCATGGATTGTGTTCTTCTGGATTATT
TTGTTTAGCAAATATTTCTTATGAACGGATGGGGAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTTATACCT-
CAATAGCATTATGAT

C.hominivorax individuo No 9.65

ATGTTAAAAATTATTATTAGAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATATAATACTTATTGAATGGTTCAAAGTTTTTATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATGTATAGAAATTTTATAAGAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATAATTTTCATATGGATTAATTTTTGT
TAAGTTTGTGAATTATTTCTTTAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTCTATTAATATTATTT
GTTATTAATTTTGTTAGTTCCTACTTTTAGAAGAATGAGATTATTTATGTTTTATTTATTTTTGAAAGAAGTTTAATTCCTACTTTATTTTTGATT
TTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTATTT
TTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTAATAATTTTATATTTAATTATGAATTATTATATTTTCTTTAGTTATAGCTT
TTTTAGTAAAAATACCAATATTTTTGGTTCAATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTTAGCGGGAAT
TATGTTGAAGTTGGGAGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTTACAATTAATAGGTTTAAAAATTTAATTTTTATTTGGGTTAGAATTAGA
TTAGTAGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAACTGATTTAAAGGCTTTAATCGCTTATTCTTCTGTAGCTCATATAGGAAAT

GTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAATTGCTCATGGATTGTGTTCTCCGGATTATTTT
GTTTAGCAAATATTTCTTATGAACGGATGGGGAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATATTAATTTTATACCTTCAATAGCATTATGAT

C. hominivorax individuo No 9.66

ATGTTAAAAATTATTATTAGAATTTTATTTTTGTTCCATTATGTTTAAATATATAATACTTATTGAATGGTTCAAAAGTTTTTIATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTGTTTTAATAAATATGTATAGAAATTTTATAAGAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATAATTTTCATATGGATTAATTTTGT
TAAGTTTGTGAATTATTTCTTAAATATTAATAGCAAGAGAGTCTGTTTATAAGTACAATAATTATATAAAATTTATTTCTATTAAATATTATTTT
GTTATTAATTTTGTAGTTCCTACTTTTAGAAGAATGAGATTATTTATGTTTTATTTATTTTTGAAAGAAGTTTAAATCCTACTTTAITTTTGA
TTTTAGGGTGGGGATATCAACCTGAACGATTGCAAGCTGGGGTATATTTATTGTTTTATACATTATTGGTTTCTTTACCAATGTTAATTGGTAT
TTTTTATTTATATAAGTTAACTGGTACTTTAAATTTTTATTTATTTAAATAATTTTATATTTAATTATGAATTAATTATAITTTTCTTTAGTTATAGC
TTTTTAGTAAAAATACCAATATTTTGGTTCATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAGGCTCCTGTTTCTGGATCTATAATTTTAGCGGGA
ATTATGTTGAAGTTGGGAGGTTATGGATTATTACGGGTTTTCCATTTTACAATTAATAGGTTTAAAATTTAATTTTATTTGGGTTAGAATTA
GATTAGTAGGGGAGTATTAGTGAGTTAATTTGTTTACGACAACTGATTTAAAGGCTTAAATCGCTTATTCCTCTGTAGCTCATATAGGAA
TTGTTTTGGCTGGATTAATAACTTTGACTTATATAGGAATTTGTGGTTCATATACATTAATAATTGCTCATGGATTGTGTTCTCCGGATTATT
TTGTTTAGCAAATATTTCTTATGAACGGATGGGGAGTCGTAGATTATTAATTAATAGGGGAATTTAAATTTTATACCTTCAATAGCATTATG
A

Chrysomya putoria Region NADH4 (GenBank)

ATGTTAAAGATTATTATTAGAATTTTATTTTTATTCCATTGTGTTTAAATACATAATACTTATTGAATGGTTCAAAAGTTTTTIATTTTTATTAAG
TTTTATTTTTATTTAATAAATATATATAGAAATTTTATATCAATTTCTTATTTATTTGGATGTGATATAATTTCTTATGGTTAATTTTATT
GAGTTTATGAATTGTTTCATTAATATTAATGGCTAGTGAGTCAATTTATAAGTATAGAAATTATACAAATTTATTTTTATTAATATTATTTTIA
TTATTGGTTTTGTTAGTATTAACFTTTIAGAAGTATAAGTTTATTTATATTTTATTTTATTTTTGAAAGTAGTTTAAATCCTACATTATTTTAAAT
TTAGGATGGGGTATCAACCTGAACGATTACAAGCAGGGGTTTATTTATTATTTTATACTTTATTAGTATCTTTACCTATATTAATTGGTATTT
TTTATTTATATAAGGTTACGGGAACFTTAAATTTTTATTTATTAATAAATTATATATTTAATTATGAAATTCFTTATTTTTCTTTAGTAATAGCT
TTTTTAGTAAAAATACCAATGTTTTAGTTCATTTATGATTGCCTAAGGCTCATGTAGAAGCTCCTGTTTCTGGTTCGATAATTTTAGCTGGAA
TTATATTGAAGTTAGGGGGATA TGTTTTATTACGTGATTTTCTTTTTTACAGTTAATAGGATTAAGTTTAAATTTTATTTGAGTTAGAATTAG
ATTAGTAGGGGAGTTTTAGTTAGACTAATTTGTTTACGTCAAACAGATTTAAAGGCTTAAATTGCTTATTCCTCAGTAGCTCATATGGGAAT
TGTATTAGCTGGTTAATAACTTTAACTTATATGGGAATTTGTGGTTCCTACACATTAATAATTGCTCATGGATTATGTTCTTCAGGTTTATTTT
GTTTAGCAAATATTGCTTATGAACGATTAGGAAGTCGTAGTTTATTAATTAATAAGGGGTTATTGAATTTTATACCTTCTATAGCATTATGAT