

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO:

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Aedes aegypti* EN EL
SALVADOR**

PRESENTADO POR:

ELIZABETH MELANY MURILLO TORRES

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2016

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO:
VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Aedes aegypti* EN EL
SALVADOR

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ASESORES

Lic. M.V.Z. Roberto Guillen Paredes

F. _____

Lic. Miguel Ángel Moreno

F. _____

Dr. Andrea Joyce

F. _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2016

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO:
VARIABILIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Aedes aegypti* EN EL
SALVADOR

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TRIBUNAL EVALUADOR

Lic. Ángela Gudelia Portillo de Pérez

F. _____

Lic. Ana Karla Castillo Ayala

F. _____

Lic. M.V.Z. Roberto Guillen Paredes

F. _____

Lic. Miguel Ángel Moreno

F. _____

Dr. Andrea Joyce

F. _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, JULIO DE 2016

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR INTERINO

M. Sc. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIA GENERAL INTERINO

DR. ANA LETICIA ZAVALETA DE AMAYO

FISCAL GENERAL INTERINO

LIC. NORA BEATRIZ MELÉNDEZ

DECANO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

LIC. MAURICIO HERNAN LOVO CORDOVA

DIRECTOR ESCUELA DE BIOLOGÍA

M. Sc. ANA MARTA ZETINO CALDERON

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios, a la vida, a mi abuela Elizabeth Torres de Murillo, mi mamá Karla Lissette de Alvarado y mi papá Juan Carlos Alvarado, tío José Israel Murillo Torres, tía Karen Salomen Murillo Torres, mis hermanos Juan Carlos y José Antonio, a Gustavo Ardon y su familia y todos mis primos por brindarme su apoyo incondicional durante la carrera y darme ánimos para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida, me gustaría expresar mi gratitud a todas aquellas personas y entidades que han contribuido a culminar mis estudios y la realización de esta investigación.

A toda mi familia por darme el apoyo y los ánimos para ser perseverante y seguir adelante.

A la Dra. Andrea Joyce por brindarme su colaboración en todas las actividades realizadas durante el estudio, gracias por sus enseñanzas, dedicación, tiempo, amistad y por enseñarme realmente el gusto por la investigación.

Un merecido y especial agradecimiento a la Universidad de Merced California, por apoyar esta investigación y compartir sus instalaciones y equipo, lo que permitió el desarrollo de este trabajo.

A mis asesores Dra. Andrea Joyce, Lic. Miguel Ángel Moreno, Lic. M.V.Z. Roberto Guillen paredes por apoyarme en toda la investigación y dedicar su tiempo.

A los jurados Lic. Ángela Gudelia Portillo de Pérez, Lic. Ana Karla Castillo Ayala, por su valiosa ayuda y aporte a la investigación.

Al Ingeniero Eduardo Romero del Departamento de vectores, por brindarme él apoya para coleccionar las muestras del estudio.

A mis amigos por apoyarme en el proceso de la investigación y animarme a seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL DENGUE.....	4
2.1.2. Agentes infecciosos.....	4
2.2. LOS MOSQUITOS.....	5
2.2.1. Características morfológicas de <i>Aedes aegypti</i>	6
2.2.1.1 Fase huevo.....	7
2.2.1.2 Fase larva.....	7
2.2.1.3 Fase pupa.....	8
2.2.1.4 Fase adulta.....	9
2.3. GENÉTICA DE POBLACIONES.....	10
2.3.1. Estructura genética de las poblaciones.....	11
2.3.2. Factores que determinan la estructura genética.....	12
2.3.2.1. Deriva Genética.....	12
2.3.2.2. Selección natural.....	13
2.3.2.3. Mutación.....	13
2.3.2.4. Flujo genético.....	14
2.4. TÉCNICAS MOLECULARES.....	14
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
2.4.2. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP).....	15
2.4.2.1. Base genética y detención de los marcadores AFLP.....	15
III. METODOLOGÍA.....	17
3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	17
3.2. METODOLOGÍA DE CAMPO.....	19
3.2.1. Método de muestreo y obtención de larvas experimentales.....	19
3.3. METODOLOGÍA DE LABORATORIO.....	20
3.3.1. Estandarización del método de extracción de DNA.....	20
3.3.2. Cantidad de ADN.....	21

3.3.3. Técnica molecular de polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).....	22
3.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	24
3.4.1. GeneMapper®.....	24
3.4.2. Distancias genéticas	25
3.4.2.1. Neighbour-joining	25
3.4.3. Estructura poblacional.....	26
3.4.3.1. Structure.....	26
3.5. Análisis de Frecuencia alélicas	26
3.6. Estimación de índice de fijación F_{ST}	27
3.7. Prueba de Mantel.....	29
IV. RESULTADOS	30
4.1. COLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	30
4.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA.....	30
4.2.1 Determinación de alelos.....	30
4.2.2 Análisis filogenético.....	32
4.2.3 Estructura poblacional.....	38
4.2.4 Frecuencia alélica	43
4.2.5 Estimación del índice de fijación F_{ST}	45
4.2.6 Aislamiento por distancias.....	47
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	49
VI. CONCLUSIÓN.....	54
VII. RECOMENDACIÓN	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIA	56
IX. ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>Aedes aegypti</i>	6
Tabla 2: Reactivos utilizados en la fase de digestión y restricción de ADN genómico y unión de los adaptadores	22
Tabla 3: Clasificación de valores de FST (Tomado de Hartl y Clark 1997).	28
Tabla 4: Número de individuos utilizados por municipio en la investigación	30
Tabla 5: Resultados de frecuencias alélicas de 6 poblaciones asociado a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 60% y < 30%.	43
Tabla 6: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociado a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entren > 90% y < 10%.	43
Tabla 7: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociado a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 70% y < 30%.	44
Tabla 8: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociado a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 60% y < 30%.	44
Tabla 9: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociado a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 60% y < 10%.	44
Tabla 10: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociado a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 50% y < 10%.	45
Tabla 11: Matriz de distancia genética de las 6 poblaciones utilizando los paquetes de programas Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Nei con el fin de obtener los valores de (FST).	45
Tabla 12: Matriz de distancia genética de los tres grupos genéticos utilizando el paquetes de programas Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Nei con el fin de obtener los valores de (FST).	46

Tabla 13: Matriz de distancia genética de las 6 poblaciones utilizando los paquetes de programas Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Reynolds con el fin de obtener los valores de (FST)..... 46

Tabla 14: Matriz de distancia genética de los tres grupos genéticos utilizando el paquetes de programas Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Reynolds con el fin de obtener los valores de (FST)..... 47

Tabla 15: Matriz de distancia geográfica en km de las 6 poblaciones por medio de Google Earth 2015. 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> modificado por Williams et al (2010).	6
Figura 2: Huevos de mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Fuente: (CDC 1995).....	7
Figura 3: Morfología de larva de mosquito <i>Aedes aegypti</i> . Fuente: Almirón (2002)	8
Figura 4: Morfología de la pupa de <i>Aedes aegypti</i> . Fuente: Almirón (2002).	9
Figura 5: Ubicación geográfica de los Municipios de muestreo en El Salvador.	18
Figura 6: Etapas básicas de la técnica molecular AFLP Vos et al. (1995).	24

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Electroferograma obtenido a partir del análisis por secuenciador ABI 3730XL y generado por el programa GeneMapper® versión 5. Usando el marcador P17 muestra (AeSo24). Los picos representan la intensidad de fluorescencia (eje vertical) y tamaño estimado..... 31

Gráfica 2: Grupos filogenéticos según análisis de árbol en forma radial expresa la relación genética entre las 6 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (So) Sonsonate ●, (Sm) San Miguel ▲, (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, (Si) San Ignacio ◆ basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972). 33

Gráfica 3: Grupos filogenéticos según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre las 6 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (So) Sonsonate ●, (Sm) San Miguel ▲, (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, (Si) San Ignacio ◆ basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972). 34

Gráfica 4: Grupo 1 filogenético según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre 4 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (Sm) San Miguel ▲, (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972). 35

Gráfica 5: Grupo 2 filogenético según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre 4 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, (Si) San Ignacio ◆, basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972). 36

Gráfica 6: Grupo 3 filogenético según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre 4 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (So) Sonsonate ●, (Sm) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972). 37

Gráfica 7: Análisis bayesiano de la estructura poblacional de *Aedes aegypti* según el programa Structure versión 2.2.3 (Pritchard et al 2000). El genoma de cada individuo está representado por una barra vertical coloreada con uno varios segmentos dependiendo del grupo al que fue asignado. 40

Gráfica 8: Relación entre (ΔK) y el número de agrupamiento (K). Según el modelo de Evanno et al. (2005). Utilizando el programa Structure Harvester. El valor de agrupamiento $k=3$ es el que mejor se ajustó a los datos..... 41

Gráfica 9: Análisis bayesiano de la estructura poblacional de *Aedes aegypti* según el programa Structure versión 2.2.3 (Pritchard et al 2000). Cada color representa los tres agrupamientos genéticos. El genoma de cada individuo está representado por una barra vertical coloreada con uno varios segmentos dependiendo del grupo al que fue asignado: (So) Sonsonate, (Ss) San Salvador, (Si)San Ignacio, (Jc) Jiquilisco, (Sm) San Miguel, (Mo) Morazán..... 42

Gráfica 10: Análisis de correlación entre Distancia Geográfica (Km) y Distancia Genética entre las 6 poblaciones de *Aedes aegypti*. Se observa claramente una relación entre las variables. Se utilizó el programa GenAlex Versión 6.5 (Peakall y Smouse 2012). 48

RESUMEN

La investigación se realizó en los municipios de San Salvador, San Ignacio, Sonsonate, San Miguel, Jiquilisco y Morazán, entre los meses de Mayo a Julio del 2014. El objetivo de la investigación fue caracterizar la variabilidad genética de poblaciones de *Aedes aegypti* en diferentes áreas geográficas de El Salvador constituyendo el primer estudio de este tipo en el país y el primer registro de la genética de este vector transmisor de los virus del dengue, zika y chikungunya en nuestro país.

Para el estudio se colectaron larvas de *Aedes aegypti* en diferentes áreas geográficas de El Salvador, se analizaron un total de 150 larvas que se llevaron adultos, se realizó la extracción del ADN genómico de cada individuo y se llevó a cabo el análisis de variabilidad utilizando la técnica molecular Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP). Los productos amplificados por PCR se secuenciaron para separar electroforéticamente los fragmentos obtenidos y se codificaron con valores de 0 y 1 de acuerdo a la ausencia y presencia de los fragmentos amplificados.

Los mosquitos analizados de los seis Municipios revelaron una variabilidad genética entre las poblaciones de San Ignacio, San Miguel y Sonsonate basándose en el árbol filogenético y análisis de estructura poblacional, además se evidenció una similitud genética entre los municipios de San Miguel y Jiquilisco. Así mismo las frecuencias alélicas para estos tres grupos fueron significativas debido a que presentaron un $p < 0.001$, por esta razón los valores estimados del índice de fijación F_{ST} , muestran claramente diferencias genéticas de moderadas a muy altas entre todas las poblaciones, además de presentar un aislamiento por distancia entre las localidades. Por lo anterior, se concluye que las poblaciones de *Aedes aegypti* estudiadas presentan tres grupos genéticamente divergentes dentro de las 6 áreas geográficas de El Salvador.

I. INTRODUCCIÓN

La clase Insecta son los organismos más abundantes del reino animal y se les encuentra en casi todos los hábitats del mundo, además presentan una gran importancia aquellos que ocasionan daños directos al ser humano, tales como los mosquitos del género *Aedes*, responsables de transmitir el mayor número de enfermedades virales, como lo es *Aedes aegypti* es el principal transmisor del virus Dengue en El Salvador (Rodhain y Rosen 1997) y otros como la Chikungunya (OPS 2011. a) y el Zika (OPS 2015).

En nuestro país en 1965 se declaró internacionalmente libre del vector *Aedes aegypti*, este reaparece y ocasiona la primera epidemia en 1978. Desde entonces su tendencia ha ido aumentando es una enfermedad endémica alternándose en periodos cíclicos de epidemia durante los últimos once años. En el 2000 se sufrió la epidemia con veintiséis fallecidos y 3,238 casos confirmados (MINSAL 2012), entre los años 2007 a 2013, se reportó a 52,293 casos confirmados por dengue (Sistema información de dengue 2013). Además de sufrir en el 2014 una epidemia por Chikungunya y Zika en el 2015.

En estudios de análisis de diversidad genética los marcadores moleculares ofrecen un gran soporte para la implementación de alternativas complementarias que logren obtener resultados que aporten al mejoramiento de las características de una especie (De Vicente 2002). Actualmente entre las técnicas moleculares más utilizadas están los microsatélites (SSR), las amplificaciones al azar de ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP).

Para el presente estudio se utilizó la técnica AFLP la cual proporciona una información genérica a través del uso de enzimas de restricción para obtener fragmentos de ADN con extremos cohesivos, los cuales se ligan a adaptadores de doble cadena y finalmente este producto ligado servirá como molde para una amplificación por PCR.

Este proceso detecta un elevado número de polimorfismos y no se requiere del conocimiento de una secuencia específica, lo que lo convierte en una herramienta potencialmente útil para el estudio genético de una población. (Van *et al.* 2002). Esta técnica inicialmente fue empleada para el análisis de diversidad genética en plantas y bacterias y luego utilizada satisfactoriamente en insectos. Por su potencia, alta reproducibilidad y elevado poder discriminativo se convirtió en una técnica ideal para el estudio de variabilidad genética de organismos como *Aedes aegypti* (Romero *et al.* 2011).

Las campañas para controlar las poblaciones de estos insectos son métodos de control físico, biológico y químico. La aplicación de insecticidas sintéticos como el temephos al 1% y deltametrina (MINSAL 2007). La amplia distribución de este vector en el territorio salvadoreño, sumado a las graves repercusiones que traen las epidemias del dengue, y otros virus antes mencionados hace necesario el desarrollo y la elaboración de estrategias de control. Estudios previos señalan que el conocimiento de la variabilidad genética de este vector puede contribuir en el diseño de estrategias de control vectorial (Bracco *et al.* 2007).

Por lo tanto es necesario conocer la genética y el flujo génico que hay entre las poblaciones de este mosquito, así como determinar si son poblaciones alopátricas o presentan polimorfismo genético esto permitirá analizar la dispersión genética como una alternativa para aportar y tener un mejor manejo de este vector y por consiguiente un mejor control de la enfermedad en nuestro país.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD DEL DENGUE

El dengue es una enfermedad infecciosa sistémica y dinámica (Fosalud 2012-2015) causada por el virus del dengue, transmitida de persona a persona a través de la picadura del mosquito vector *Aedes aegypti* infectado, (MINSAL.AR 2009, OPS 2011. b). En El Salvador y en todos los países de América afectados por esta enfermedad, el principal transmisor del virus es *Aedes aegypti*, mosquito de hábitos domiciliarios, por lo que la enfermedad es predominantemente urbana (MINSAL AR 2009).

Posee un amplio espectro clínico que incluye las formas asintomáticas, oligosintomáticas y formas graves, con resultados impredecibles. Y puede expresarse por 3 fases: fase febril, fase crítica y fase de recuperación. Después de un período de incubación (4-10 días) (Fosalud 2012-2015), la enfermedad comienza con fiebre de inicio repentino de tres a cinco días de duración rara vez más de siete, regularmente difásica, cefalea intensa, dolores retro orbitales, articulares, musculares, anorexia, alteraciones gastrointestinales y erupción (Thirion 2003).

En la fase febril pueden aparecer fenómenos hemorrágicos de poca intensidad, como petequias, epistaxis. En personas de piel oscura la erupción a menudo no es visible. La recuperación puede acompañarse de fatiga y depresión duradera. En cambio, la fiebre hemorrágica de dengue (FHD) es otra forma más grave, en la que pueden sobrevenir hemorragias y a veces un estado de shock, que puede llevar a la muerte. Los síntomas de la fiebre de dengue varían según la edad y el estado general de salud del paciente (Feldman *et al.* 2009).

2.1.2. Agentes infecciosos

El Dengue es una enfermedad causada por un virus con ARN perteneciente al género de los Flavivirus y a la familia de los Togaviridae (anterior grupo B de los Arbovirus). Se reconocen 4 serotipos. Con el arreglo taxonómico siguiente:

Grupo: Arbovirus

Familia: Flaviviridae

Género: Flavivirus

Serotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4

El virus del dengue persiste en la naturaleza mediante un ciclo de transmisión hombre - mosquito. Luego de una ingestión de sangre infectante, el mosquito puede transmitir el virus después de un período de 8 a 12 días de incubación extrínseca dependiendo de la temperatura ambiental (Feldman *et al.* 2009).

Como se mencionó anteriormente existen cuatro variantes del virus del dengue: (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) (OPS, 2011). La infección con un serotipo confiere inmunidad permanente contra el mismo (inmunidad homóloga) y sólo por unos meses contra los otros serotipos (inmunidad heteróloga), pero seguirá expuesta a las demás variantes. De esta manera, una persona podría tener dengue hasta cuatro veces, una por cada serotipo (MINSAL.AR 2009).

2.2. LOS MOSQUITOS

Los mosquitos pertenecen al Orden Diptera, Familia Culicidae; son los artrópodos hematófagos más importantes que se alimentan del hombre, de otros mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Los mosquitos son los únicos vectores de patógenos que causan paludismo, fiebre amarilla y dengue (Harwood y James 1987).

Según Rivas y Zavaleta (1997) reportan la siguiente clasificación taxonómica de *A. aegypti*:

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Aedes aegypti*.

Reino	Animal
Phylum	Artropoda
Clase	Insecta
Orden	Díptera
Familia	Culicidae
Genero	<i>Aedes</i>
Especie	<i>aegypti</i>

2.2.1. Características morfológicas de *Aedes aegypti*

El *Aedes aegypti*, como todos los mosquitos, tiene dos etapas bien diferenciadas en su ciclo de vida: fase acuática con tres formas evolutivas diferentes: (huevo, larva y pupa) y fase aérea: imago ha adulto. Las cuales se componen de una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento (Fernández 2009). (Ver Figura 1).

Para Pratt *et al.* (1976), los hábitos de *Aedes aegypti* son antropófilos y domésticos, con permanencia de criaderos en las viviendas y sus alrededores, tales como depósitos de agua, neumáticos, recipientes de todo tipo, botellas, pilas, entre otros; los cuales les sirven como criadero.

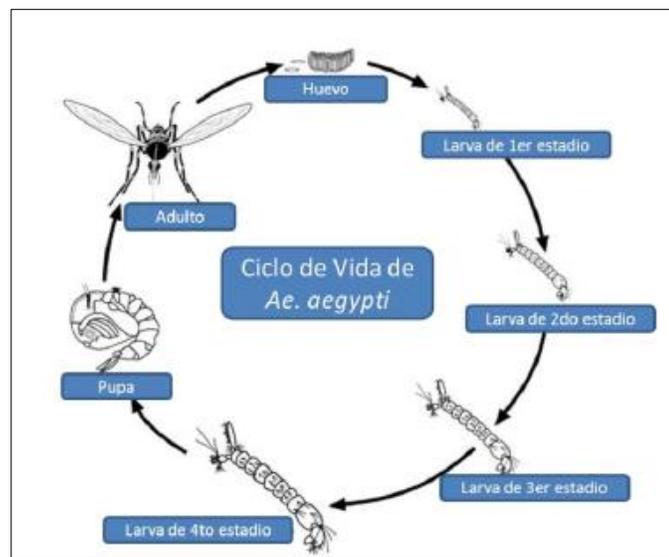


Figura 1: Ciclo de vida de *Aedes aegypti* modificado por Williams *et al* (2010).

2.2.1.1 Fase huevo

Nelson (1986) plantea que los huevos miden aproximadamente 1 milímetro de longitud, en el momento de postura son blancos, pero muy rápidamente adquieren un color negro brillante. Son fecundados durante la postura y el desarrollo embrionario se completa en 48 horas. Los huevos son capaces de resistir largos períodos de desecación por meses a un año, al volver a tener contacto con el agua la acción bacteriana de la materia orgánica disminuye la tensión de oxígeno estimulando la eclosión (ver figura 2).



Figura 2: Huevos de mosquito *Aedes aegypti*. Fuente: (CDC 1995).

Rivas y Zavaleta (1997), informan que la hembra deposita los huevos de uno en uno en las partes húmedas, sobre materia vegetal flotante en depósitos con agua. Los huevos pueden ser depositados en masas o navecillas; cada hembra puede poner entre 100 y 500 huevecillos.

2.2.1.2 Fase larva

El periodo de larvas comprende cuatro grados evolutivos denominados primero, segundo, tercero y cuarto estadio. El segmento posterior anal tiene cuatro branquias lobadas para la regulación osmótica, además de presentar un sifón el cual lo utiliza para captar oxígeno atmosférico (Nelson 1986).

A simple vista se diferencia de otros géneros por tener un sifón corto y ancho, en posición de reposo con relación a la superficie del agua (ver figura 3).

Su desplazamiento es característico, en forma de ocho; son sensibles a los cambios bruscos de intensidad de la luz, lo que ocasiona que se sumerjan al fondo del recipiente cuando son perturbadas o se proyecta una sombra (Nelson 1986).

Las larvas pasan la mayor parte del tiempo alimentándose, tienen sedas bucales en forma de abanico que emplean para atrapar las partículas y microorganismos que encuentran en el agua, por lo que se les considera omnívoras (Colvard 1978). Las condiciones favorables de nutrición, son a temperaturas de 25°C a 29°C de igual manera se establece que son incapaces de resistir temperaturas inferiores a los 10°C y superiores a 44°C o 46°C (Nelson 1986).

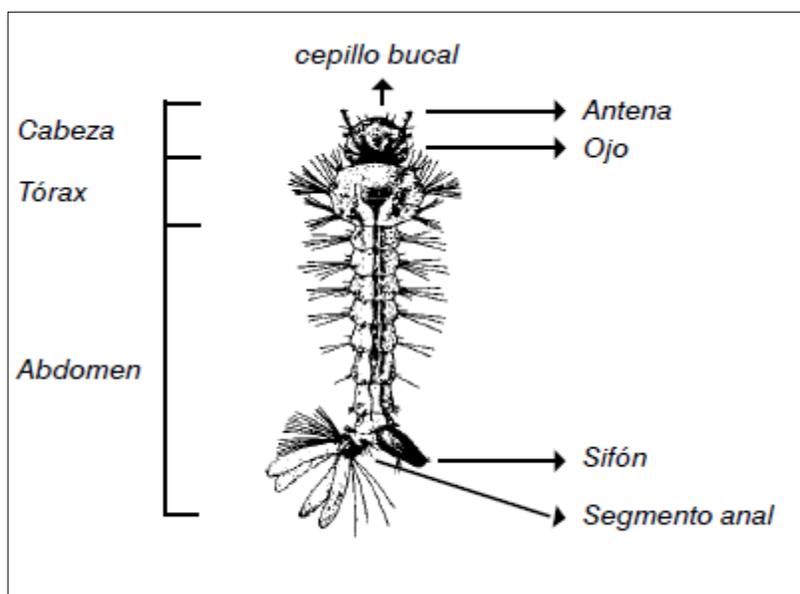


Figura 3: Morfología de larva de mosquito *Aedes aegypti*. Fuente: Almirón (2002)

2.2.1.3 Fase pupa

El estado de pupa corresponde a la última etapa de maduración de la fase acuática ver figura 4, esta no requiere alimentación y entre los 28°C y 32°C, completa su desarrollo (Pratt *et al.* 1976).

En la base del tórax tiene un par de estructuras respiratorias (trompetas), que hacen contacto con la superficie del agua permitiéndole tomar oxígeno atmosférico

contenido en el aire y cuando está madura cambia de color de café claro a negro (Rivas y Zavaleta 1997).

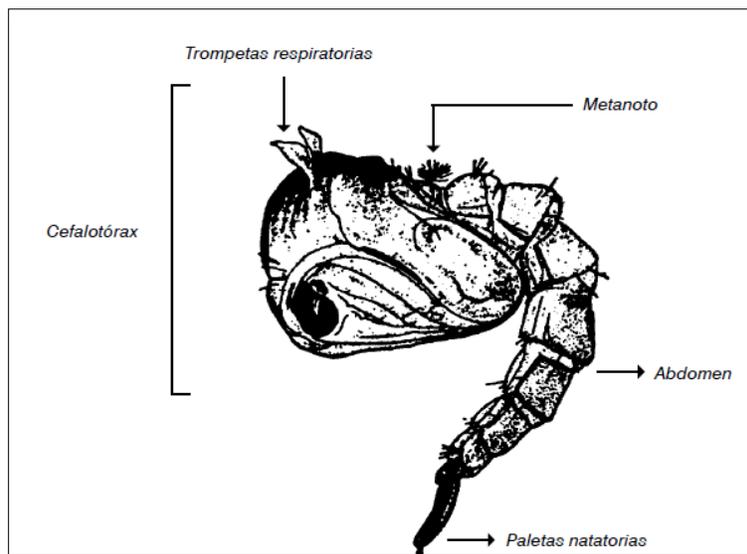


Figura 4: Morfología de la pupa de *Aedes aegypti*. Fuente: Almirón (2002).

2.2.1.4 Fase adulta

Los adultos de *Aedes aegypti* son de color oscuro (castaño oscuro o negro) con rayas blanco-plateadas. El tórax presenta un diseño en forma de lira y las patas son anilladas. El patrón de coloración es igual en machos y hembras. Miden aproximadamente 5 mm de largo, siendo los machos de menor tamaño que las hembras. El pico es largo; en los machos es de tipo chupador y en las hembras es de tipo picador-chupador. A los lados del pico están los palpos maxilares, mucho más largos en los machos que en las hembras (dimorfismo sexual). Las antenas, de función sensorial, son más pilosas en los machos que en las hembras (dimorfismo sexual). Como todos los insectos dípteros, tienen el primer par de alas, los halterios, que son para el equilibrio durante el vuelo (Martínez 1987).

Sobre el cuerpo de los insectos se encuentran las llamadas sensilas, las cuales están innervadas y conectadas a centros cerebrales específicos, estas sirven como receptores sensoriales y presentan varios tipos que difieren en su morfología y en los estímulos que pueden detectar.

En los mosquitos las sensilas detectan señales tanto físicas, como el zumbido de la hembra durante el apareamiento; señales químicas como CO₂, para localizar al huésped vertebrado, para obtener sangre y feromonas y para encontrar pareja (Chapman 1998).

Los adultos no se alejan grandes distancias, rara vez se separan del lugar donde nacieron. Por lo general una hembra adulta no sobrepasa los 50 m de distancia de vuelo durante su vida (Nelson 1986). Salvo si algún requerimiento vital no lo encuentra a su alrededor o algún otro factor los está perturbando, su presencia es prácticamente un indicio certero de la proximidad de los criaderos. El apareamiento ocurre a pocas horas de haber emergido y de haber levantado el vuelo, una vez inseminada la hembra no necesita volver a copular y podrá producir varias veces huevos fértiles si se alimenta con sangre antes de cada ovipostura (Thirion 2003).

Su alimentación, como la de otros insectos de su especie hembra y macho liban néctar, jugos vegetales u otros carbohidratos de cualquier fuente accesible, pero además, la hembra hematófaga (pica a cualquier organismo vivo que tenga sangre caliente), ya que después del apareamiento necesita sangre (Feldman *et al.* 2009), que le es necesaria para la maduración de los ovocitos, y aumentar la viabilidad de los huevos.

La cantidad de huevos que producen las hembras por cada ovipostura está directamente en relación con el volumen de sangre que ingirieron, regularmente 72 horas o menos son necesarias para que los ovocitos estén listos para fecundarse; la hembra grávida busca un sitio con agua en donde poner los huevos, y así se cierra el ciclo de vida (Feldman *et al.* 2009).

2.3. GENÉTICA DE POBLACIONES

La evolución biológica consiste en el cambio en las características hereditarias de grupos de organismos a través de las generaciones. Ocurre como consecuencia de varios procesos fundamentales, tanto aleatorios como no aleatorios. La variación en las características de los organismos de una población, se origina a través de la mutación al azar de secuencias de ADN (los genes) que

las determinan. Además, la variación genética aumenta por recombinación durante la reproducción sexual, que produce nuevas combinaciones de genes, y también por el flujo génico, es decir, la entrada de nuevos genes desde otras poblaciones (Cabrera y Camacho 2009). Según los mismos autores el cambio evolutivo dentro de una población consiste en un cambio en las frecuencias génicas y genotípicas. Los dos principales procesos impulsores del cambio evolutivo son la selección natural y la deriva genética (Cabrera y Camacho 2009).

La selección natural resulta de cualquier diferencia heredable en la tasa de supervivencia o reproducción entre organismos portadores de diferentes alelos o genotipos (diferencias en eficacia biológica). En la mayoría de los casos, las circunstancias ambientales determinan qué variante tiene la mayor eficacia biológica, y una consecuencia común de la selección natural es la adaptación, una mejora en la habilidad media de los miembros de la población para sobrevivir y reproducirse en su ambiente (Cabrera y Camacho 2009).

La deriva genética resulta de la variación al azar en la supervivencia y reproducción de los diferentes genotipos. En la deriva genética, las frecuencias de los alelos fluctúan por puro azar. Ocasionalmente, un alelo reemplazará a los otros (es decir, se fijará en la población). La deriva genética es la fuerza predominante cuando los alelos de un gen son neutros, esto es, cuando no difieren substancialmente en sus efectos sobre la supervivencia o la reproducción, y actúa más intensamente cuanto más pequeña es la población. La deriva genética resulta en cambio evolutivo, pero no en adaptación, aunque en combinación con la selección puede favorecerla (Cabrera y Camacho 2009).

2.3.1. Estructura genética de las poblaciones

Las poblaciones naturales pueden estar definidas como un grupo de individuos que comparte un mismo *pool* de genes. La estructura genética de una población natural es la consecuencia de los rasgos de vida, los cuales están determinados por los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión, incluyendo el sistema de reproducción (Slatkin 1994). Estos procesos son

considerados como factores intrínsecos, sin embargo, también pueden estar influenciados por la naturaleza física de los hábitats (factores extrínsecos), como la presencia de insectos polinizadores, animales dispersores de semillas, barreras naturales, distancia geográfica, etc.

Es por eso que en muchas poblaciones naturales se espera que haya una gran estructuración genética debido a las barreras de dispersión que previenen los cruces aleatorios, así como también en otras poblaciones no existe una estructura genética debido a un flujo genético continuo.

2.3.2. Factores que determinan la estructura genética

2.3.2.1. Deriva Genética

La deriva genética ocurre en poblaciones relativamente pequeñas donde algunos alelos pueden cambiar su frecuencia simplemente debido al azar. La mayoría de los organismos son diploides, debido a que tienen dos ejemplares de cada gen. Los gametos de estos organismos portan solo uno de los dos ejemplares (alelos) de cada gen. El que un gameto lleve un alelo u otro, es una cuestión de azar, por lo que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los cigotos de la siguiente generación solo puede describirse como un proceso probabilístico (Galtier *et al.* 2000).

En cada generación esperamos una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento durante esta conducta fluctuante uno de los alelos no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre.

El resultado de la Deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones. Es necesario mencionar que la deriva genética tiende a formar una población homocigótica, además se tiende a eliminar los genotipos heterocigóticos (Galtier *et al.* 2000).

2.3.2.2. Selección natural

Es la fuerza creativa que lleva al proceso de adaptación de los organismos al compaginar cambios en su entorno físico y biológico. La selección natural resulta en una “descendencia con modificación”, mientras el genotipo provee la parte heredable, la selección actúa sobre el fenotipo (forma visible), esto incluye el desarrollo, morfología y comportamiento. La idea de la selección natural como un proceso fundamental de los cambios evolutivos fue iniciada por Charles Darwin y Alfred Russel Wallace (Ayala y Kiger 1984) e implica que las poblaciones naturales estén constituidas por un *pool* genético con algunas variantes poco frecuentes (Futuyma 1986). El entorno es crucial para la selección natural, dado que sus límites son los que determinan que caracteres son los beneficiosos y dentro de ello, los cambios tanto en espacio y tiempo traen consigo modificaciones en los caracteres de los organismos.

2.3.2.3. Mutación

Ocasionalmente pueden llegar a producirse errores en la replicación del ADN, estos cambios son denominados mutaciones. Una mutación es un cambio estable y heredable en el material genético dependiendo del tipo de mutación. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Muchas de éstas variantes pueden ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de éstas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie (Araguren Méndez *et al.* 2005).

La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética. Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al ambiente. A su vez, una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales o deletéreas de los individuos, haciéndolos menos adaptados, y aumentando la probabilidad de extinción de la especie. Las mutaciones no tienen ninguna dirección respecto a la adaptación, son como un cambio al azar.

Este cambio puede producir una falta de significado, y por eso la mayoría de las mutaciones son deletéreas. Pero a veces, ciertos cambios pueden introducir nuevos significados, permitiendo nuevas funciones (Araguren Méndez *et al.* 2005).

2.3.2.4. Flujo genético

El flujo genético se define como la transferencia de material genético entre poblaciones dado por el movimiento de individuos o de sus gametos (Avice y Hamrick 1996). El impacto del flujo de genes está determinado por la capacidad de dispersión de la especie, así como por barreras geográficas y estructura poblacional (Orell *et al.* 1999). El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente.

Para Slatkin (1994) si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo genético cada población evoluciona en forma casi independiente.

2.4. TÉCNICAS MOLECULARES

Se denomina marcadores moleculares a secuencias de ADN que permiten identificar o diferenciar genotipos que pueden ser genes, segmentos de ADN cuya codificación no se conoce y se transmiten de manera mendeliana (López 2002). Por su parte Ferreira y Grattapaglia (1998), define como marcador molecular a todos y cualquier fenotipo molecular procedente de la expresión de un gen, como es el caso de las isoenzimas o de segmentos específicos de ADN (correspondientes expresadas o no del genoma). Los marcadores moleculares del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ellos son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards 1998).

2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de una polimerasa de ADN termoestable (Echenique *et al.* 2004). La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos (pequeñas moléculas de ADN de cadena sencillas) utilizando como indicadores (primers) que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena “blanco” de la amplificación (Ferreira y Grattapaglia 1998).

El método implica la ejecución de una serie repetida de ciclos (conocidos como ciclo térmico), cada una de las cuales involucran la desnaturalización del ADN, la unión del indicador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del indicador, de una doble cadena mediante la acción de polimerasa, de lo anterior resulta una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Azofeifa 2006).

2.4.2. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Esta técnica representa la tecnología más reciente para la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariontes y eucariontes. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de detección de polimorfismo vía PCR (Ferreira y Grattapaglia 1998).

2.4.2.1. Base genética y detención de los marcadores AFLP.

El análisis de AFLP consta esencialmente de 3 etapas según: (Vos *et al.* 1995, Wolfe y Liston 1998).

A. Digestión y restricción de ADN genómico

Las enzimas de restricción, también conocidas como endonucleasas, son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster del material genético a partir de una secuencia que reconocen una de corte raro y una de corte frecuente, generalmente se utilizan MseI-CAT, CAC y CAC que reconoce y corta 4 pares de bases y EcoRI-

ACG, ACT y ACA, que reconoce y corta 6 pares de base dentro de una secuencia. Esto permite cortar ADN de hebra doble, donde reconocen secuencias palindrómicas (secuencias que se leen igual en ambas direcciones).

B. Unión de los adaptadores

La unión de secuencias específicas (adaptadores) a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la restricción. En este paso, se generan extremos con una secuencia conocida que permitirá que el fragmento sea amplificado mediante PCR.

C. Amplificación preselectiva y Amplificación selectiva

Consiste en la selección de fragmento que serán amplificados con iniciadores que corresponden a la secuencia específica del adaptador que se une a los bordes digeridos más un nucleótido extra (A, G, C, o T) en el extremo 3'.

Este proceso permite discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman y amplificar solo aquellos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para la base adicional. Se asume que el 25% de todos los fragmentos están en igual probabilidad de tener A, C, T o G en cada sitio. Con los productos obtenidos de la amplificación se realiza nuevamente PCR, conocida como amplificación selectiva. Se utilizan iniciadores con la misma secuencia que los usados en la amplificación preselectiva.

III. METODOLOGÍA

3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL ÁREA DE ESTUDIO

El Salvador está situado en América Central, en la zona tropical, al norte de la línea ecuatorial y al este del meridiano de Greenwich, entre las coordenadas 13° 09' y 14° 27' latitud Norte y los meridianos 87° 41' y 90° 08' longitud Oeste del meridiano de Greenwich. Limita al norte con la República de Honduras, al sur con el Océano Pacífico (307 kilómetros de costa), al este con la República de Honduras y la República de Nicaragua (Golfo de Fonseca de por medio), y al oeste con la República de Guatemala (MARN 2012).

Municipio de Sonsonate, Cabecera del municipio de Sonsonate del Departamento de Sonsonate situado a 220 msnm. Entre las coordenadas geográficas centrales 13°71'45" LN y 89°72'40" LWG.

Municipio de San Miguel, Cabecera del municipio de San Miguel del Departamento de San Miguel, situado a 110 msnm. Entre las coordenadas geográficas centrales 13°47' 84" LN y 88°17'77" LWG.

Municipio de San Salvador, Cabecera del municipio de San Salvador del Departamento de San Salvador, situado a 650 msnm. Entre las coordenadas geográficas centrales 13°70'63" LN y 89°20'35" LWG.

Municipio de Morazán, Cabecera del municipio de San Francisco Gotera del Departamento de Morazán, situado entre 500 y 1.000 msnm. Entre las coordenadas geográficas centrales 13°77'67" LN y 88°12'98" LWG.

Municipio San Ignacio, Cabecera del municipio de Chalatenango del Departamento de Chalatenango, situado a 1044 msnm. Entre las coordenadas geográficas centrales 14°33'86" LN y 89°17'66" LWG.

Municipio de Jiquilisco, Cabecera del municipio de Jiquilisco del Departamento de Usulután, situado a 40 msnm. Entre las coordenadas geográficas centrales 13°19'45" LN y 88°34'20" LWG.

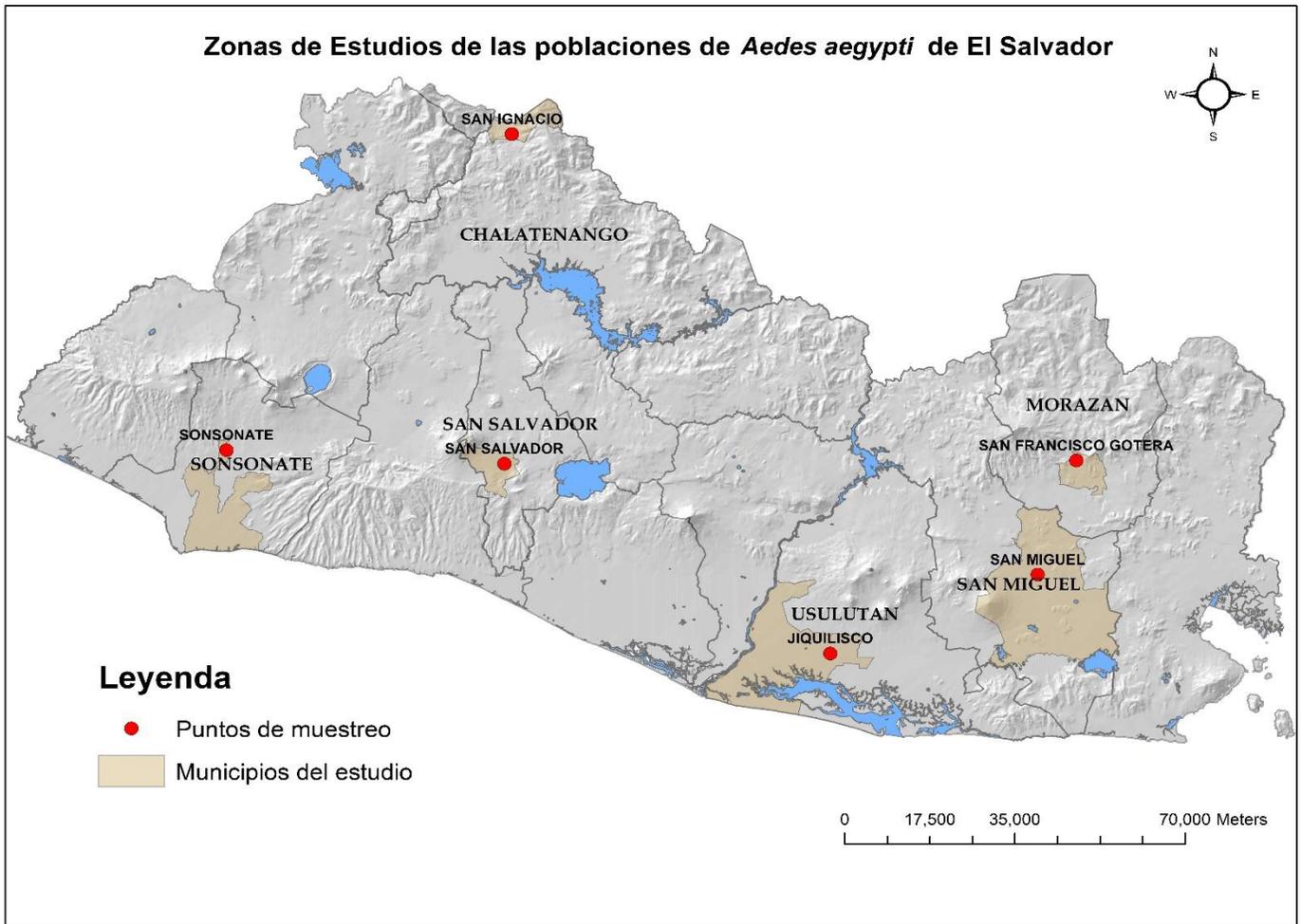


Figura 5: Ubicación geográfica de los Municipios de muestreo en El Salvador.

3.2. METODOLOGÍA DE CAMPO

3.2.1. Método de muestreo y obtención de larvas experimentales

El presente estudio se llevó a cabo entre los meses de mayo a julio del 2014, se colectaron larvas de *Aedes aegypti* en seis departamentos de El Salvador, ubicados en tres zonas diferentes: zona occidental (Sonsonate), zona central (San Salvador y Chalatenango) y zona oriental (Usulután, San Miguel y Morazán). Las muestras colectadas en el municipio de Sonsonate fueron de distintos puntos: de la colonia San Antonio y la colonia El Carmen, Para las muestras del municipio de San Salvador se colectaron en la colonia La Fosa y El Barrio San Jacinto.

En San Ignacio se colectaron en la colonia La Villa, las muestras del municipio de Jiquilisco se colectaron en las colonias La Siembra y Las Flores, las muestras del municipio de San Miguel fueron colectadas en la colonia Las Américas y las muestras del municipio de Morazán fueron colectadas en diferentes puntos de las colonias Morazán y La Colonia San José. En el anexo 1 se representa el número de muestras utilizadas en la fase de laboratorio, sitios de colecta, departamento, municipio, fecha de colecta, depósito de colecta y las coordenadas geográficas del sitio de colecta.

Las larvas se colectaron utilizando goteros, colador (para obtenerlas), una lámpara de mano; una vez capturadas fueron transferidas a un frasco de vidrio transparente de boca ancha con tapadera de rosca, de un litro de capacidad, el cual, no fue llenado de agua en su totalidad, dado que tiene que cerrarse y proveer oxígeno a las larvas mientras se llevaron al laboratorio. Los frascos fueron empacados de manera que no sufrieran movimientos bruscos durante el transporte tal como lo establece la OMS (1993).

3.3. METODOLOGÍA DE LABORATORIO

Posteriormente, las larvas fueron llevadas al laboratorio de patología en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), se eligieron al azar 50 larvas por municipio teniendo un total de 300 larvas, seguidamente estas se colocaron en vasos plásticos con agua destilada, se mantuvieron en jaulas de 20 cm de largo y 10 cm de ancho hasta que emergieran los adultos. Inmediatamente los mosquitos en su etapa adulta y dentro de sus jaulas fueron colocados a un congelador de -20°C por 5 minutos, para luego identificar taxonómicamente a las especie y separar por sexos utilizando estereoscopio, materiales estériles y una guía taxonómica para su identificación (Almirón 2002).

De los 300 adultos de los 6 municipios identificados se seleccionaron 140 hembras (por ser la responsable de transmitir los virus a la población) y se colocaron en tubos eppendorf 1.5 ml con una solución de etanol al 90% debidamente rotulada. Las muestras fueron utilizadas para la extracción de ADN genómico.

3.3.1. Estandarización del método de extracción de DNA

Esta fase se llevó acabo en el laboratorio de extracción de ADN de CENSALUD. La estandarización de la técnica de extracción de ADN de las muestras se realizó según el protocolo modificado de Qiagen DNEasy® Blood and Tissue Extraction Kit (Joyce *et al.* 2010).

Las muestras son retiradas del etanol al 90%, y se trasladaron a un tubo eppendorf de 1.5 ml al que se le añadió 180 µl de buffer ATL y 20 µl de Proteinasa K, seguidamente se agitaron por 5 segundos en un vortex, y se dejó incubando por 24 horas a una temperatura de 65°C. Después de 24 horas las muestras se centrifugaron a 2000 RPM por 10 segundos, posteriormente se añadió 200 µl de buffer AL a cada muestra, y se agitaron por 5 segundos seguidamente se incubaron por 10 minutos a una temperatura de 70°C, pasado el tiempo correspondiente se centrifugaron las muestras, inmediatamente se colocaron 200 µl de etanol 100% y se centrifugaron a 2000 RPM por 10 segundos.

Se pipeteo 600 µl de la solución obtenida y se trasladó a una columna de agitación previamente rotulada, se centrifugó a 8000 RPM por 1 minuto. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y las columnas de agitación, se colocaron en tubo de colecta, se le agregaron 500 µl de AW1 a cada muestra posteriormente se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante nuevamente, en un tubo de colecta, se le añadió 500 µl de AW2 a cada muestra, rápidamente se centrifugaron a 12000 RPM por 3 minutos.

Por último se sujetaron las columnas de agitación y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml añadiéndole 100 µl de buffer AE (calentado previamente a 70°C), se dejaron reposar por un minuto las muestras, seguidamente se centrifugaron a 8000 RPM por 1 minuto (ver Anexo 2). Al final las muestras se colocaron en un congelador a -20°C.

Las muestras de ADN, se colocaron en tubos Eppendorf 1.5 ml, añadiendo 50 µl de ADN genómico, y se ubicaron en bolsas plásticas Ziplock® a temperatura ambiente, posteriormente se llevaron al laboratorio de Genética de la Universidad de California, Merced, Estados Unidos bajo las condiciones previamente descritas de dicha Universidad.

3.3.2. Cantidad de ADN.

Las 140 muestras de ADN procesadas se analizaron en el Qubit 2.0 fluorometer (marca Invitrogen by Life Technologies). El cual mide la cantidad de ADN en ng/ml, para ello se utilizaron dos reactivos para esta fase el Qubit Buffer y Qubit reagent, se mezclaron los 2 reactivos y se le añadió a cada muestra de ADN. Se realizaron 2 lecturas a cada muestra, se sumaron y se dividieron entre 2 para obtener el resultado total debido a que las lecturas pueden variar y lo importante para esta técnica molecular es tener suficiente cantidad de ADN (Ver Anexo 3). Al finalizar las muestras fueron almacenadas en un congelador. Posteriormente estas muestras fueron utilizadas en la técnica molecular de polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

3.3.3. Técnica molecular de polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

Para la fase digestión y restricción de ADN genómico y unión de los adaptadores se utilizaron los siguientes reactivos para realizar una mezcla de enzimas, en esta fase del total de muestras antes mencionada se incluyeron repeticiones de 7 individuos de San Miguel y 3 individuos de Sonsonate teniendo al final un total de 150 muestras (Joyce *et al.* 2010).

Tabla 2: Reactivos utilizados en la fase de digestión y restricción de ADN genómico y unión de los adaptadores

10X T4 DNA Ligase Buffer	T4 DNA Ligase (NEB 202CL=2000U ³ /μl)
0.5 M NaCl, Diluted BSA (1x)	<i>Mse</i> I adaptor pair
<i>Mse</i> I (NEB 525S=10U/ μl)	<i>Eco</i> RI adaptor pair
<i>Eco</i> RI (NEB 101T=100U/ μl)	Sterile Agua Destilada

Se prepararon las reacciones para cada individuo, se colocaron 5.5 μl de enzima de la mezcla preparada anteriormente y 5.5 μl sustrato de (1°ADN). Dejando incubar a temperatura ambiente por 12 horas.

Seguidamente se añadió 189 μl de solución buffer TE_{thin} a cada reacción, se mezclaron las muestras en el vortex y seguidamente se centrifugaron; se rotularon de la siguiente manera: D4PSA (dilución para amplificación preselectiva).

Se realizó la fase de amplificación preselectiva, se preparó una mezcla con los siguientes reactivos AFLP Amplificación CORE mix y AFLP Preselectivo primer. Se colocaron 16 μl de mezcla y 4 μl de ADN diluido (D4PSA). Se mezclaron en vortex, se centrifugaron para pasar al PCR. De igual manera se rotularon las muestras de la siguiente manera: ATS (Secuencia amplificada). Después de pasar por el PCR se realizó una nueva banda de tubos para PCR utilizando 10 μl del producto amplificado (ATS) y 190 μl TE_{thin} y se rotularon las muestras de la siguiente manera: DATS (Secuencia amplificada diluida).

Las condiciones para el PCR radicó en un calentamiento inicial 95°C durante 1 min seguido por 20 ciclos a 95°C durante 20 s, 56°C durante 30 s, y 72°C durante 90 s con una retención final a 75°C durante 5 min.

En la fase final de la amplificación selectiva se utilizaron los siguientes primers P₁₇ *Msel*-CAT/*EcoRI*-ACG, para P₁₈ *Msel*-CAC/*EcoRI*-ACT y P₁₉ *Msel*-CAC/*EcoRI*-ACA (todos de la marca Applied Biosystems). Primero se realizó una mezcla con los reactivos para cada una de las muestras: PCR Platinum Supermix, *Msel*-CAC, *EcoRI*-ACT. Se añadió 17 µl de la mezcla y 3 µl de DATS de la amplificación preselectiva se mezclaron en el vortex inmediatamente se centrifugaron para pasar al PCR.

El cual presento las siguientes condiciones: un calentamiento de 95°C durante 1 min, 12 ciclos de 95°C durante 20 s, para 65°C 40 s con una disminución de 0.7°C por ciclo, 72°C durante 90 s, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 20 s, 56°C durante 40 s, 72°C durante 90 s, y un final de 72°C. Al finalizar se rotularon las muestras según el primers utilizado, se guardaron las muestras en bolsas plástica ziplock®. El mismo procedimiento se ejecutó para P₁₇ y P₁₉.

Seguidamente se añadió Formamida HiDi y Liz 500, de tal manera que fueron empacadas y rotuladas adecuadamente (ver anexo 4), para secuenciar el ADN 3130x1 ABI en la Universidad de Berkeley, Departamento de Biología Celular y Molecular para separar electroforéticamente los fragmentos obtenidos. Posteriormente, los resultados se analizaron mediante el programa GeneMapper®.

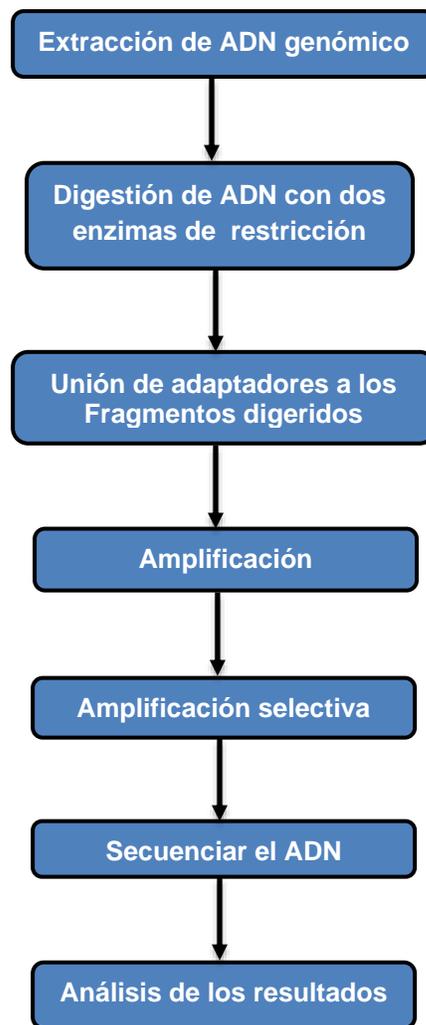


Figura 6: Etapas básicas de la técnica molecular AFLP Vos *et al.* (1995).

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

3.4.1. GeneMapper®

El programa GeneMapper® permite un rápido análisis de los resultados obtenidos con el analizador genético (Applied Biosystems) referentes a análisis de fragmentos y genotipado mediante microsatélites, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y polimorfismos de fragmentos de restricción (AFLPs), entre otros.

Los datos generados por los picos en un electroferograma pueden mostrar información sobre la cantidad y tamaño de los fragmentos, la altura de picos y los pares de bases, respectivamente, la altura de un pico se determina por la intensidad en el punto de fluorescencia. Los pares de bases (pb) constan de la unidad del tamaño de un fragmento es estimado mediante el software GeneMapper® versión 5. El cual representa la presencia o ausencia de fragmentos, luego se descargaron los datos de alelos para cada genotipo en cada uno de los loci, organizándolo en un archivo de Microsoft Excel.

3.4.2. Distancias genéticas

Los árboles filogenéticos evalúan las coincidencias y diferencias entre un grupo de organismos. Cuantos más caracteres muestran en común dos organismos, presumiblemente más unidos evolutivamente estarán, y más cercanos dentro del árbol.

3.4.2.1. Neighbour-joining

Con los electroferogramas obtenidos en este estudio, se realizó un análisis con el método de distancia de neighbour-joining (NJ) y un análisis Bayesiano (Estructura poblacional); a partir de los cuales se generó un árbol no enraizado, donde se visualiza las relaciones existentes entre los individuos teniendo en consideración la distancia genética entre sus genotipos y la asignación probabilística de los individuos a grupo diferentes. En esta fase al momento que se realizó la hoja de cálculo, se encontró un individuo de la población de Jiquilisco por debajo del promedio aceptable, por lo tanto se eliminó de la base de datos.

Modificando así el número de muestra total a 149 individuos, teniendo en cuenta las repeticiones de las dos poblaciones. Para el análisis filogenético se utilizó la hoja de cálculo de Excel con las 149 muestras y los 299 alelos, copiando los datos a un bloc de notas en formato de txt, se corrió el subprograma Restdis del paquete de programas Phylip 3.695. Utilizando los parámetros cambiar fragmentos, modelo original y la longitud de sitio (que fue 16 al final).

Se determinó la distancia de (Nei) entre todos los individuos; obteniendo así un “output” el cual se usó en el subprograma neighbour-joining del paquete de programas Phylip 3.695, usando el parámetro de tomas de datos aleatorio. De lo anterior, se obtuvo un árbol en forma radial y un árbol en forma tradicional por medio del Software Mega6 (Joyce *et al.* 2010).

3.4.3. Estructura poblacional

3.4.3.1. Structure

Se utilizó para agrupar a los individuos con genotipos similares dentro de cada población. El Structure 2.2.3 utiliza un algoritmo bayesiano a agruparse los individuos en K, que se define como el número de poblaciones en un conjunto de datos. Los parámetros utilizados para el análisis son los siguientes: el análisis para los insectos fueron diploides, se usó el modelo admixture con frecuencias alélicas correlacionadas, las interacciones, para este caso se fijaron 10000 interacciones (burnin length) y 10000 interacciones MCMC (Cadenas de Markov y Montecarlo), estableciéndose un rango de 2 a 7 poblaciones, se llevaron a término 20 réplicas o simulaciones por cada K, según lo sugerido por Pritchard *et al.* (2000). El valor más probable de K fue determinado, según el método propuesto por Evanno *et al.* (2005) implementado en el programa Structure Harvester.

3.5. Análisis de Frecuencia alélicas

Para el análisis de frecuencias se utilizaron los datos de presencia /ausencia “1” y “0” generados por el programa GeneMapper® ver. 5. Se tomó en cuenta el porcentaje de asociación entre > 90% y < 10%, entre > 70% y < 30%, entre 60% y 30%, entre > 60% y < 10% y entre > 50% y < 10%. Se utilizó una hoja de Excel teniendo en cuenta los datos de las 6 poblaciones con 149 individuos y 299 alelos se efectuaron la suma de cada alelo y se calculó el porcentaje de cada uno de ellos.

Se realizó la prueba de Chi-cuadrado utilizando Microsoft Excel en la cual se contó como positivo (+) la presencia de cada alelo y negativo (-) su ausencia, tomando el valor de 0.05 establecido de acuerdo al nivel de confianza del 95% las muestras son significativas si $p < 0.05$.

El valor observado del estadístico X^2 (Chi-cuadrado) se representa por la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum \frac{(O-Ei)^2}{Ei}$$

Dónde:

X^2 = Chi-cuadrada

Σ = Sumatoria

O_i = Frecuencia observada de realización de un acontecimiento determinado

E_i = Frecuencia esperada o teórica

Además, se determinaron los grados de libertad para el presente estudio según la siguiente fórmula: $Gl = n - 1$. Dónde: n = es el número de clases

3.6. Estimación de índice de fijación F_{ST}

La teoría de los índices de fijación o estadísticos F , fue propuesta por Wright en 1965. El índice de fijación (F_{ST}), mide el efecto de las divisiones de una población en la heterocigocidad de las subpoblaciones debido a la deriva génica. Este coeficiente es útil, para determinar las divergencias genéticas entre las subpoblaciones.

El índice de fijación F_{ST} mide la reducción de la heterocigosis de una subpoblación debido al efecto combinado de la migración y la deriva genética

$$F_{ST} = (HT - HS) / HT$$

Dónde:

HT = es la heterocigosis esperada de un individuo tomado al azar dentro del total de las poblaciones

HS = es la heterocigosis media esperada en dicha población

El índice F_{ST} es siempre positivo. Tiene un valor cercano a 0 cuando no hay subdivisión (con apareamientos al azar) por lo que no existen divergencias genéticas entre las poblaciones; y tiene un valor cercano a 1 cuando existe subdivisión extrema (aislamiento completo), de manera que valores de F_{ST}

menores a 0.05 indican una diferenciación genética insignificante, mientras que valores mayores a 0.25 muestran una diferenciación genética significativa entre las poblaciones. Para ello utilizamos el estimador de Nei (1972) y Reynolds y Col (1983) entre las poblaciones. El procedimiento de la información se llevó a cabo por el paquete de programas Phylip 3.65 específicamente utilizando Gendist en la opción Nei y la opción Reynolds. A fin de obtener los valores de F_{ST} .

Tabla 3: Clasificación de valores de F_{ST} (Tomado de Hartl y Clark 1997).

F_{ST}	Diferenciación Genética
0.00 – 0.05	Pequeña
0.05 – 0.15	Moderada
0.15 – 0.25	Alta
$F_{ST} > 0.25$	Muy alta

➤ Formula de Nei 1972

$$D = -1n \frac{Jxj}{\sqrt{Jx Jy}}$$

➤ Formula de Reynolds 1983

$$DL = 1n (1 - F_{ST})$$

Para analizar el índice de fijación se utilizó la hoja de cálculo de Excel la cual se usa en el análisis de estructura poblacional, ordenando cada una de las poblaciones por separado, para sumar los “0” y “1” de cada alelo, dividiendo la suma de los alelos entre la cantidad de individuos por población. Copiando el resultado de las seis poblaciones a un bloc de notas el cual se corrió con el programa Gendist. Así mismo, se ordenaron los datos para obtener la distancia genética de los tres grupos (Rojo, Verde y Azul) utilizando (Gráf. 9) y separando los individuos dependiendo del color al que pertenecen.

3.7. Prueba de Mantel

Se llevó a cabo el test de Mantel (1967), con el cual se compararon las matrices de distancia genética y geográfica, Este test mide el grado de relación, Z entre las dos matrices, siendo:

$$Z = \sum X_{ij} Y_{ij}$$

Donde X_{ij} e Y_{ij} son los elementos de las matrices X e Y. El test de significación generalmente se lleva a cabo comparando el valor de Z con su distribución permutacional, es decir, la distribución que se obtiene si se compara una matriz (por ejemplo X) con todas las posibles matrices en las que el orden de los elementos de la otra matriz (Y) se han permutado, en el estudio se realizaron 999 permutaciones, para evaluar la posible correlación entre la distancia genética y geográfica. El análisis se realizó con el programa Genalex versión 6.5 (Peakall y Smouse 2012), el cual es una aplicación para el programa Microsoft Office Excel.

IV. RESULTADOS

4.1. COLECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

De las muestras colectadas en los diferentes puntos de los municipios, se utilizaron 140 muestras en la extracción y cantidad de ADN genómico, pero para el uso de la técnica Molecular “Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados” (AFLP), se incluyeron 7 repeticiones de individuos de San Miguel y 3 repeticiones de Sonsonate siendo un total de 150 muestras. A partir de la realización de la hoja de cálculo para el análisis de los datos se encontró un individuo de la población de Jiquilisco por debajo del promedio aceptable, por lo tanto, se eliminó de la base de datos. Teniendo al final un total de 149 muestras (ver tabla 4).

Tabla 4: Número de individuos utilizados por municipio en la investigación

Nº de individuos	Departamento	Municipio
22	San Salvador	San Salvador
23	Chalatenango	San Ignacio
26	Sonsonate	Sonsonate
31	San Miguel	San Miguel
23	Usulután	Jiquilisco
24	Morazán	Morazán

4.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

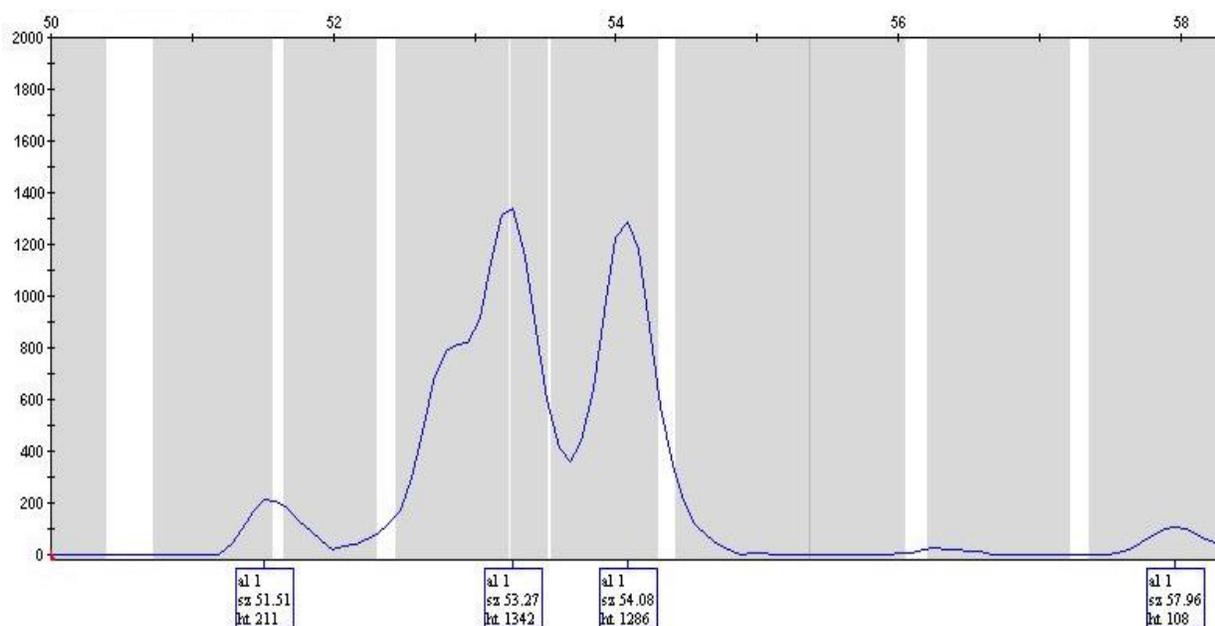
4.2.1 Determinación de alelos

Las muestras amplificadas se colocaron en electroforesis capilar por medio de un secuenciador ABI PRISM® 3730XL, para determinar su genotipo utilizando tres marcadores moleculares P₁₇, P₁₈ y P₁₉. Los datos generados por el secuenciador, se analizaron en el programa GeneMapper® ver. 5. En él se generaron electroferogramas (Ver gráfica 1), donde se representa la visualización de un individuo para el marcador P₁₇ muestra AeSo24. Para el eje “x” se encuentra señalado la presencia de picos (al = 1), el número de pares de bases (sz= 53.27) y la altura de los picos (ht=1342), en la parte superior, se determina la longitud del

fragmento amplificado. En el eje “y” representa la cantidad amplificada de la muestra por medio de unidades de fluorescencia relativa.

Los picos superiores a 100 unidades de fluorescencia se consideraron como picos verdaderos, esto debido a que la altura de los picos es directamente proporcional a la fluorescencia detectada, que a su vez está determinada por la cantidad de ADN amplificado.

Los datos obtenidos con el programa GeneMapper® se trasladaron a Microsoft Excel, para continuar con el siguiente análisis filogenético en el cual se obtuvieron 149 individuos y 299 alelos para los tres marcadores moleculares de las seis poblaciones.



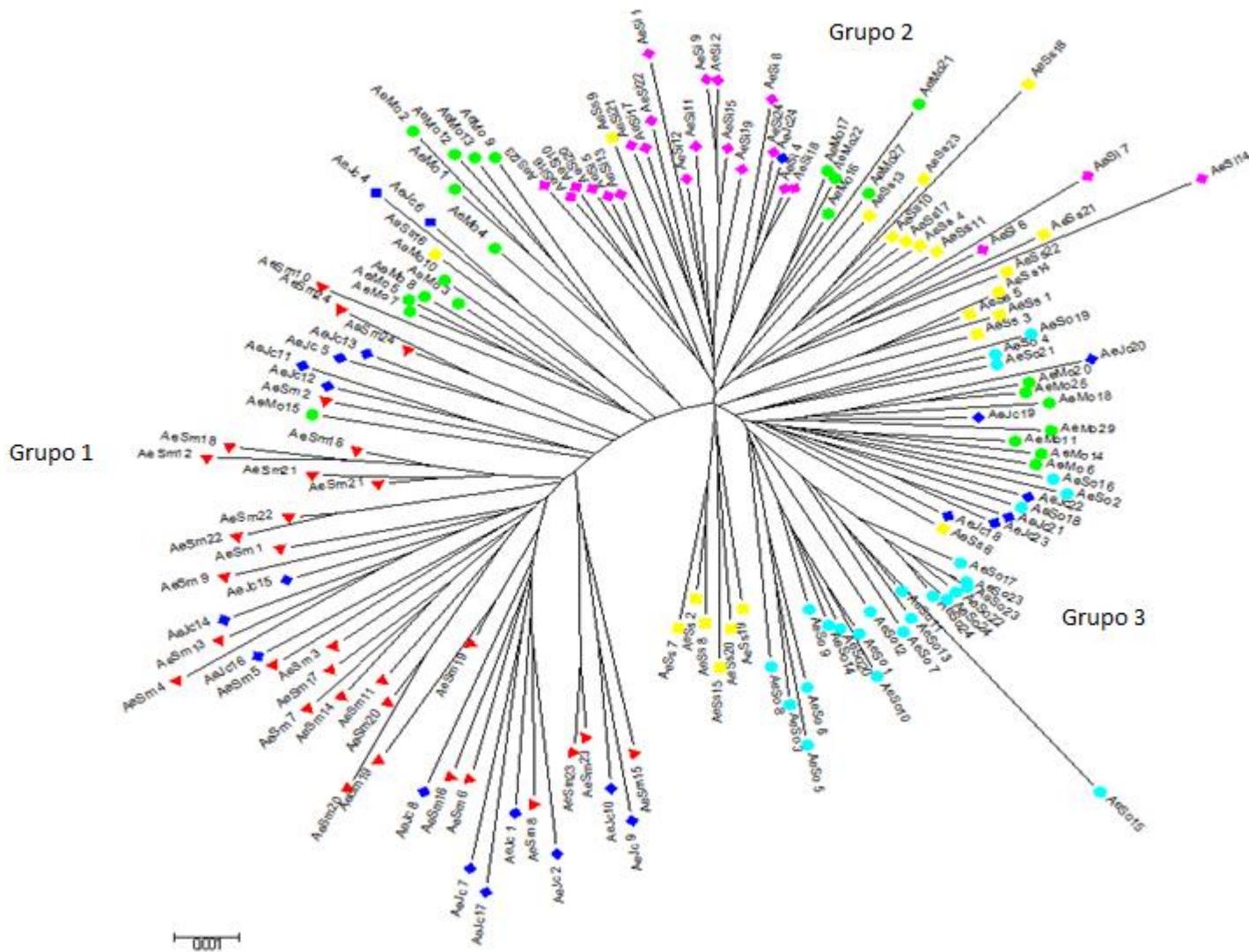
Gráfica 1: Electroferograma obtenido a partir del análisis por secuenciador ABI 3730XL y generado por el programa GeneMapper® versión 5. Usando el marcador P17 muestra (AeSo24). Los picos representan la intensidad de fluorescencia (eje vertical) y tamaño estimado.

4.2.2 Análisis filogenético

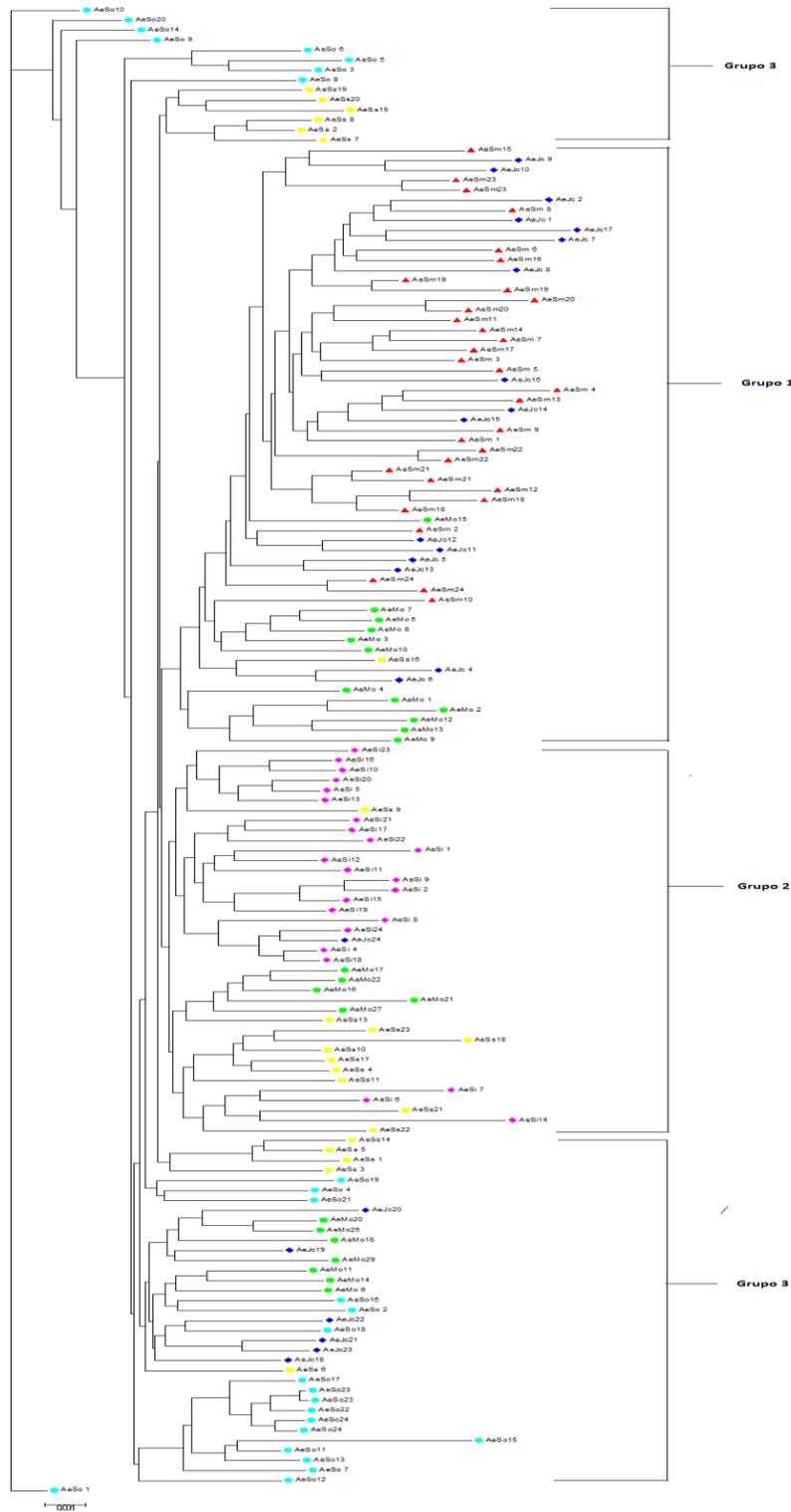
Mediante el análisis de Neighbour-joining (Saitou y Nei 1987) se muestra la presencia de tres grupos genéticamente distintos conformados por las seis poblaciones: So = Sonsonate, Si = San Ignacio, Ss = San Salvador, Jc = Jiquilisco, Sm = San Miguel y Mo = Morazán. Tal como se observa en la gráfica 2, el grupo 1 está conformado por 60 individuos, de los cuales 31 individuos proceden del municipio de Sm, 16 de Jc, 12 de Mo y 1 de Ss. El grupo 2 está conformado por 39 individuos de los cuales 23 proceden del municipio de Si, 10 de Ss, 5 de Mo y 1 de Jc. El grupo 3 está conformado por 50 individuos de los cuales 26 proceden del municipio de So, 11 de Ss, 7 de Mo y 6 de Jc.

La organización de los nodos (Gráf.3) representado en un árbol tradicional, se observa un agrupamiento coherente, el cual expresa la relación filogenética entre los individuos de los seis municipios en tres grupos diferentes. En el grupo 1 los individuos del municipio de San Miguel y Jiquilisco son genéticamente similares incluyendo algunos individuos de Morazán (ver Gráf.4). En el grupo 2 se encuentran todos los individuos del municipio de San Ignacio y algunos individuos del municipio de San Salvador, Morazán y Jiquilisco con una similitud genética entre ellos (Gráf.5).

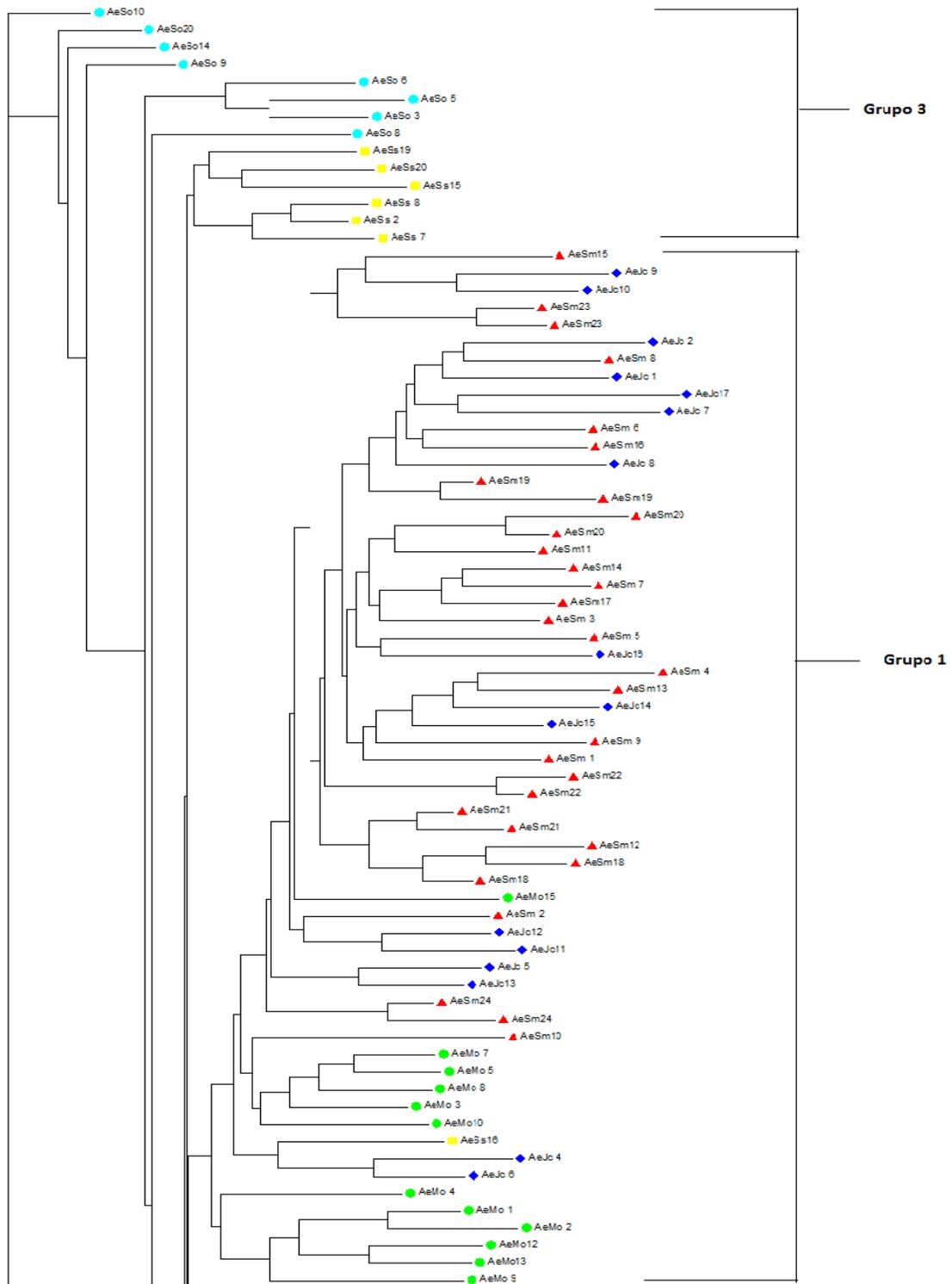
La mayor heterogeneidad se presentó en el grupo 3 donde se agruparon individuos de cuatro municipios. En este grupo están representados todos los individuos del municipio de Sonsonate los cuales forman clados totalmente separados de los individuos restantes pertenecientes a este grupo, procedentes de municipios diferentes (Gráf.6).



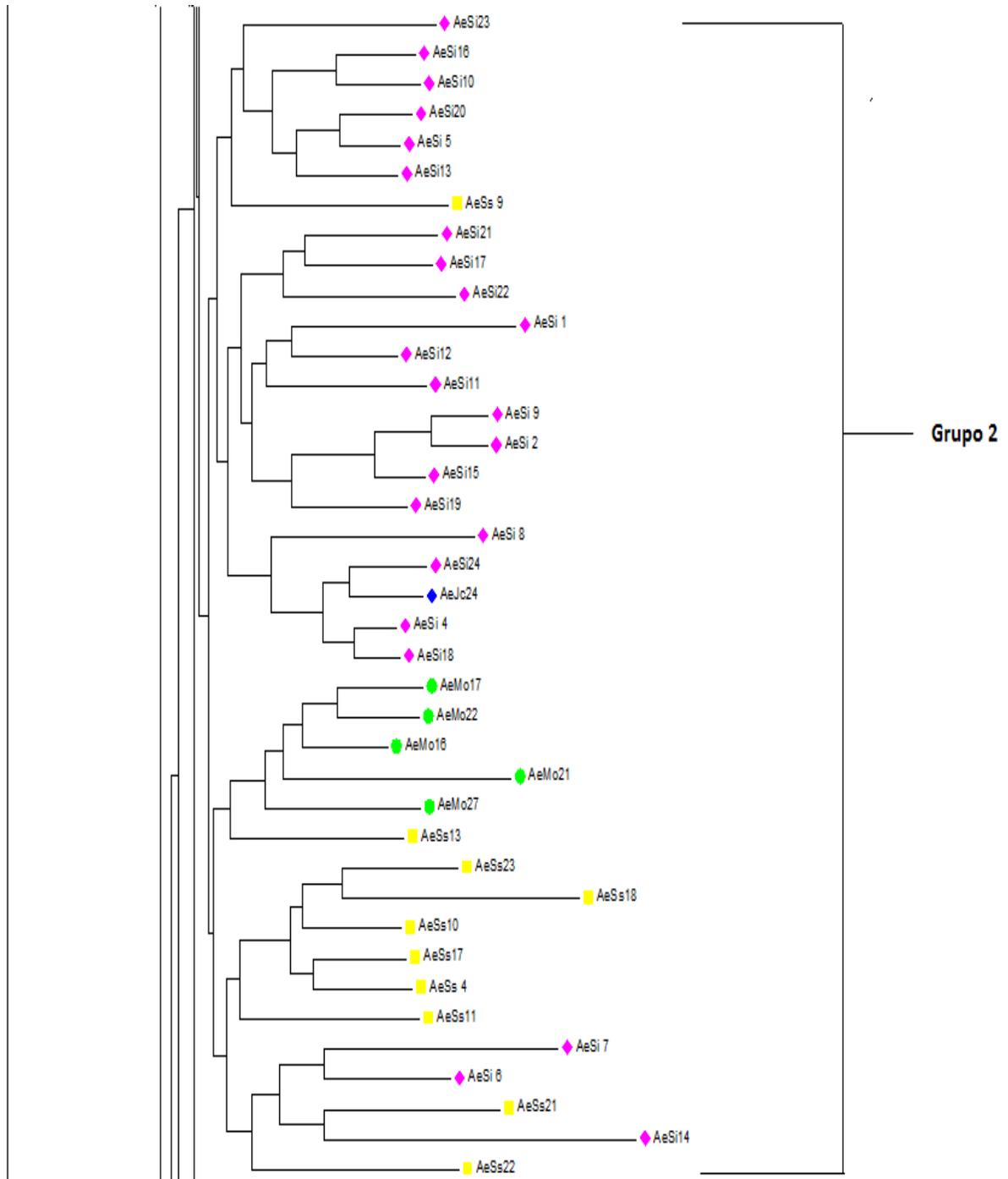
Gráfica 2: Grupos filogenéticos según análisis de árbol en forma radial expresa la relación genética entre las 6 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (So) Sonsonate ●, (Sm) San Miguel ▲, (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, (Si) San Ignacio ◆ basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972).



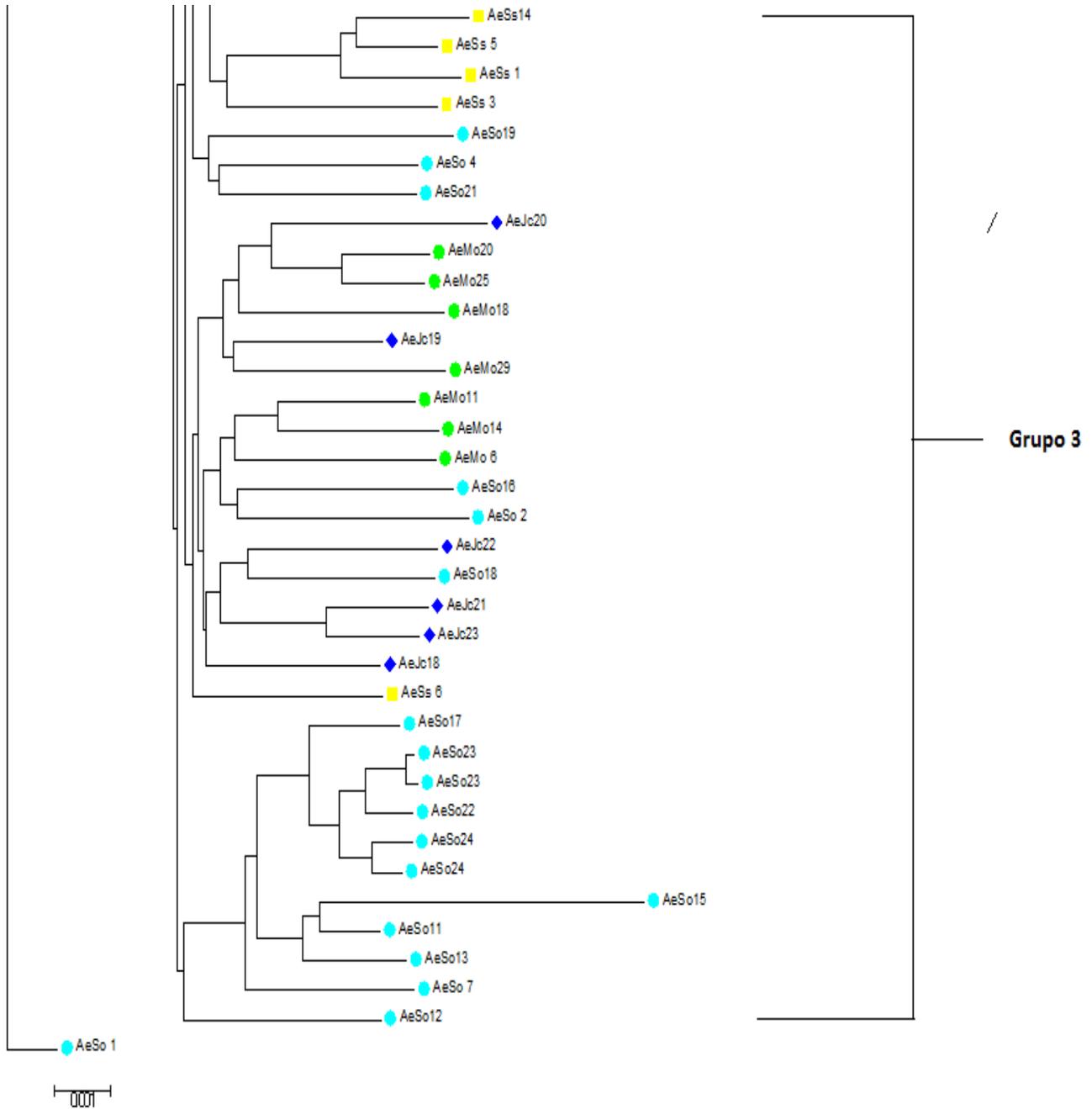
Gráfica 3: Grupos filogenéticos según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre las 6 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (So) Sonsonate ●, (Sm) San Miguel ▲, (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, (Si) San Ignacio ◆ basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972).



Gráfica 4: Grupo 1 filogenético según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre 4 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (Sm) San Miguel ▲, (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972).



Gráfica 5: Grupo 2 filogenético según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre 4 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, (Si) San Ignacio ◆, basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972).



Gráfica 6: Grupo 3 filogenético según análisis de árbol tradicional expresa la relación genética entre 4 poblaciones de *Aedes aegypti* de los municipios de colecta. Cada población está representada por una figura de color: (So) Sonsonate ●, (Sm) (Mo) Morazán ●, (Jc) Jiquilisco ◆, (Ss) San Salvador ■, basado en el método de agrupamiento Neighbour-joining y la distancia genética de Nei (1972).

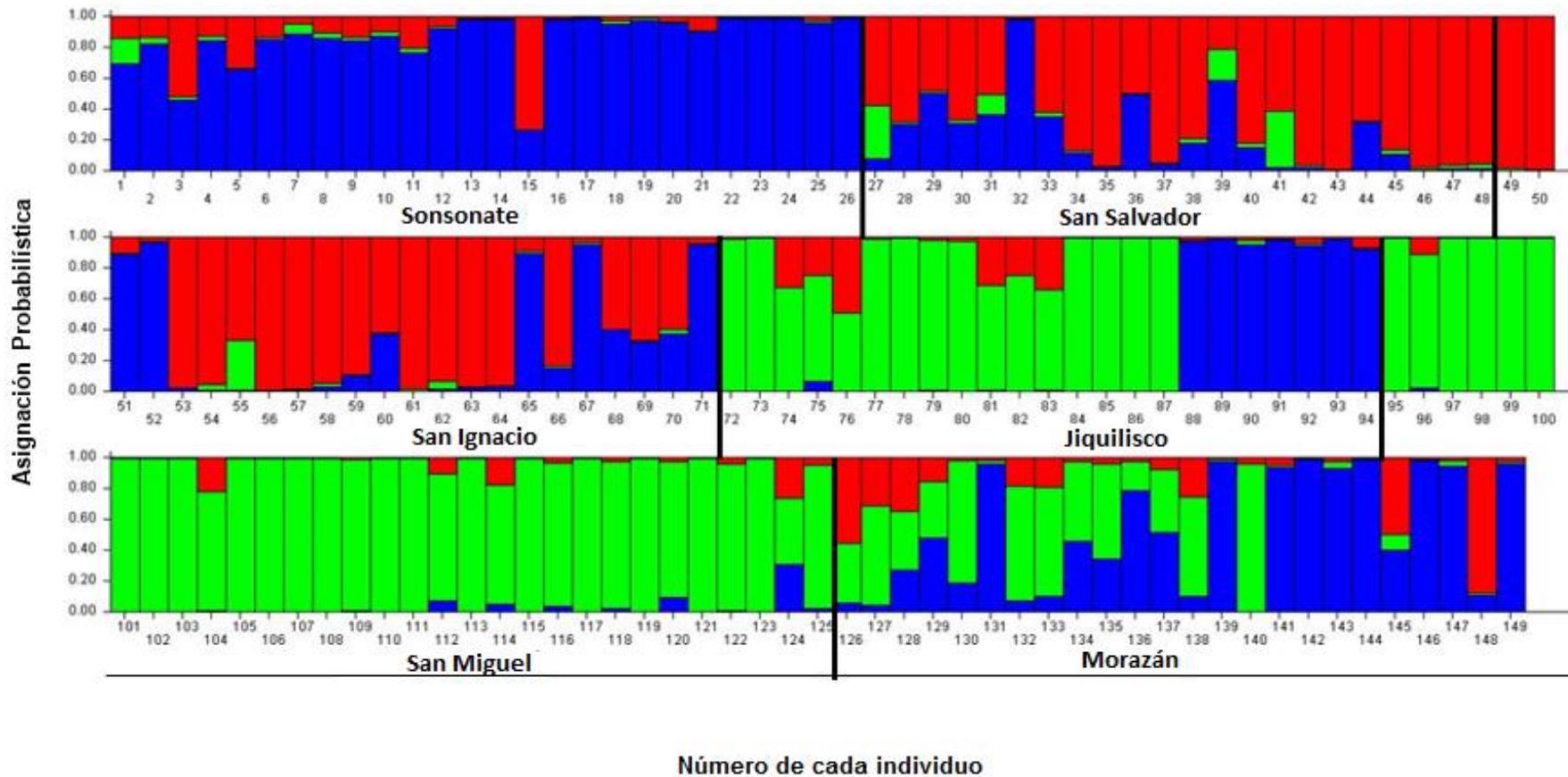
4.2.3 Estructura poblacional

La prueba de asignación de individuos a partir del método Bayesiano mediante el programa Structure, si detectó una estructura poblacional para los individuos de *Aedes aegypti*. Cada individuo está representado por una barra vertical, cuando la barra vertical es de un solo color significa que es el 100 % del genoma de ese individuo y pertenece a ese Cluster (K), mientras que si tiene dos o más colores significa que comparten el genoma, y generan otros Cluster (K). En la gráfica 7 se observa el total de individuos (149) asignados en tres grupos de Cluster (K=3). Por otro lado, al aplicar el modelo de Evanno *et al.* (2005), el valor de agrupamiento que ajustó fue el de K=3 (Gráf 8), lo cual confirma que el valor de K en el programa de Structure Harvester presenta el valor de ΔK como el mayor en relación al número de agrupamientos (Evanno *et al.* 2005), lo que implica la presencia de 3 grupos genéticamente distintos.

Como se observa en la gráfica 9, cada agrupamiento genético determinado por el programa Structure se encontró conformado por distinto número de individuos. El primer agrupamiento genético (color rojo) se encuentra conformado por 2 individuos de Sonsonate, 19 de San Salvador, 18 de San Ignacio y 3 individuos de Morazán, lo que representa el 28.2% del total de los individuos evaluados. Así mismos se puede observar que San Salvador y San Ignacio están compartiendo muchos alelos entre ellos.

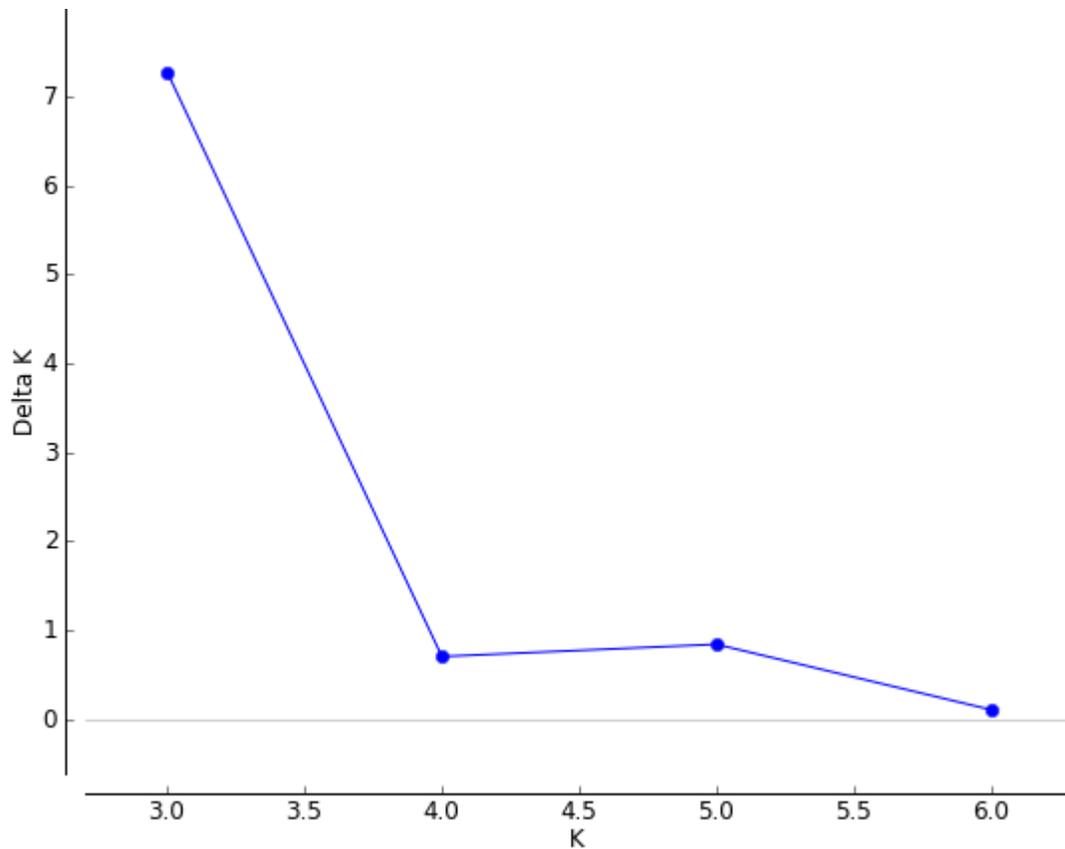
El segundo agrupamiento genético (color verde) representa el 37.6% del total de individuos y está representado por individuos de San Miguel con 31, Jiquilisco con 16 y Morazán con 9 individuos. Todos los individuos de San Miguel están presentes en este grupo. Además, muestra similitud genética con el municipio de Jiquilisco.

El tercer agrupamiento genético (Color azul) que representa el 34.2% del total de la muestra, se encuentra conformados por individuos de Sonsonate con 24, San Salvador con 3, San Ignacio con 5, Morazán con 12 y Jiquilisco con 7 individuos. Estas agrupaciones coinciden con los resultados obtenidos en el análisis de árbol tradicional basado en distancia genética (Nei) mostrando que las poblaciones de Sonsonate, San Ignacio y San Miguel son genéticamente divergentes entre sí.

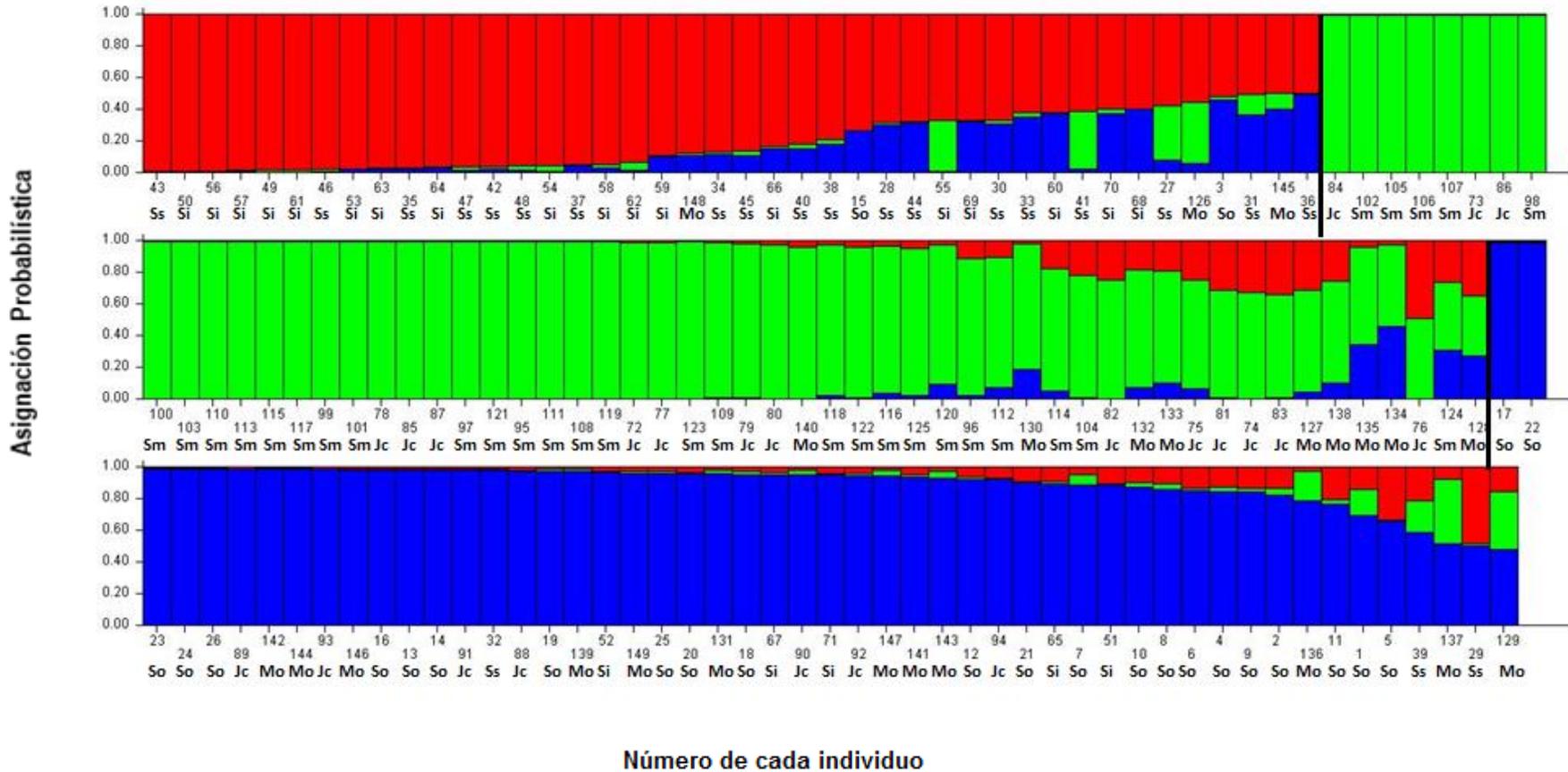


Gráfica 7: Análisis bayesiano de la estructura poblacional de *Aedes aegypti* según el programa Structure versión 2.2.3 (Pritchard *et al* 2000). El genoma de cada individuo está representado por una barra vertical coloreada con uno varios segmentos dependiendo del grupo al que fue asignado.

La grafica 8 muestra los valores de ΔK calculados para cada K inferido, en este caso la mayor relación al número de agrupamientos se obtuvo con un $K=3$ lo que significa que se encontraron diferencias genéticas entre los individuos dando origen a tres poblaciones de *Aedes aegypti* genéticamente diferentes. Por lo tanto se acepta muestra hipótesis. Existe variabilidad genética de las poblaciones de *Aedes aegypti* en diferentes zonas geográficas de El Salvador.



Gráfica 8: Relación entre (ΔK) y el número de agrupamiento (K). Según el modelo de Evanno *et al.* (2005). Utilizando el programa Structure Harvester. El valor de agrupamiento $k=3$ es el que mejor se ajustó a los datos.



Gráfica 9: Análisis bayesiano de la estructura poblacional de *Aedes aegypti* según el programa Structure versión 2.2.3 (Pritchard *et al* 2000). Cada color representa los tres agrupamientos genéticos. El genoma de cada individuo está representado por una barra vertical coloreada con uno varios segmentos dependiendo del grupo al que fue asignado: (So) Sonsonate, (Ss) San Salvador, (Si) San Ignacio, (Jc) Jiquilisco, (Sm) San Miguel, (Mo) Morazán.

4.2.4 Frecuencia alélica

Se analizaron las frecuencias alélicas para determinar cuáles alelos están asociados a las poblaciones a partir de los datos de presencia /ausencia “1” y “0” generados por el programa GeneMapper® ver. 5. Las frecuencias se calcularon en diferentes porcentajes para cada municipio y para los tres grupos genéticamente divergente entre > 90% y < 10%, entre >70% y < 30%, entre > 60% y < 30%, entre > 60% y < 10% y entre > 50% y < 10%.

En la tabla 5 se puede observar cinco alelos asociados entre > 60% de los individuos presentes y < 30% de los individuos ausentes. Presentando un “p” valor significativo para todos los alelos con un $p < 0.001$ para Mse1 CAT/EcoR1-ACG_68, Mse1-CAC/EcoR1-ACT_121, Mse1-CAC/EcoR1-ACT_153 y Mse1-CAC/EcoR1-ACT_164, Mse1-CAC EcoR1-ACA_51.

Tabla 5: Resultados de frecuencias alélicas de 6 poblaciones asociados a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 60% y < 30%.

Alelos	Sonsonate % / (+/-)	San Salvador % / (+/-)	San Ignacio % / (+/-)	Jiquilisco % / (+/-)	San Miguel % / (+/-)	Morazán % / (+/-)	χ^2	P	Significancia
Mse1 CAT/EcoR1-ACG_68	92% / (24/2)	81% / (18/4)	91% / (21/2)	3% / (7/16)	22% / (7/24)	79% / (19/5)	63.23	<0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACT_121	26% / (7/19)	13% / (3/19)	4% / (1/22)	78% / (18/5)	61% / (19/12)	66% / (16/8)	46.32	<0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACT_153	65% / (17/9)	22% / (5/17)	4% / (1/22)	8% / (2/21)	67% / (21/10)	16% / (4/20)	52.90	<0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACT_164	7% / (2/24)	9% / (2/20)	8% / (2/21)	21% / (5/18)	67% / (21/10)	29% / (7/17)	48.25	<0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51	96% / (25/1)	86% / (19/3)	95% / (22/1)	30% / (7/16)	3% / (1/30)	66% / (16/8)	94.58	<0.001	Significativo

Se encontró un alelo fuertemente asociado entre > 90% y < 10%, en la tabla 6 se observa el alelo Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51 con un $p < 0.001$, mostrando al grupo azul (Sonsonate, Jiquilisco, Morazán y San Ignacio) con una frecuencia del 96%.

Tabla 6: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociados a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 90% y < 10%.

Alelos	Rojo % / (+/-)	Verde % / (+/-)	Azul % / (+/-)	χ^2	P	Significancia
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51	8% / (37/5)	7% / (4/52)	96% / (49/2)	116.16	<0.001	Significativo

En la tabla 7 se muestra las frecuencias alélicas para el porcentaje: > 70% y < 30% encontrando 6 alelos con un $p < 0.001$ para cada uno de ellos: Mse1-CAC/EcoR1-ACT_2, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_12, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_17, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_38, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51 y Mse1-CAC/EcoR1-ACA_60.

Tabla 7: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociados a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 70% y < 30%.

Alelos	Rojo % / (+/-)	Verde % / (+/-)	Azul % / (+/-)	χ^2	P	Significancia
Mse1-CAC/EcoR1-ACT_2	9%/(4/38)	71%/(40/16)	25%/(13/38)	47.46	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_12	71%/(30/12)	8%/(5/51)	76%/(39/12)	65.72	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_17	80%/(34/8)	26%/(15/41)	90%/(46/5)	59.76	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_38	73%/(31/11)	17%/(10/46)	78%/(40/11)	53.58	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51	88%/(37/5)	7%/(4/52)	96%/(49/2)	116.16	<0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_60	73%/(31/11)	16%/(9/47)	98%/(50/1)	87.59	<0.001	Significativo

Se puede observar en la tabla 8 las frecuencias entre el porcentaje > 60% y < 30% encontrando 4 alelos con un $p < 0.001$ significativo, para Mse1-CAC/EcoR1-ACA_30, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_38, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51 y Mse1-CAC/EcoR1-ACA_76, el cual presenta el 100% de su frecuencia alélicas para el grupo rojo (San Ignacio, San Salvador y Morazán).

Tabla 8: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociados a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 60% y < 30%.

Alelos	Rojo % / (+/-)	Verde % / (+/-)	Azul % / (+/-)	χ^2	P	Significancia
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_30	69%/(29/13)	16%/(9/47)	88%/(45/6)	67.24	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_38	73%/(31/11)	17%/(10/46)	78%/(40/11)	53.58	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51	88%/(37/5)	7%/(4/52)	96%/(49/2)	116.16	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_76	100%/(42/0)	8%/(5/51)	68%/(35/16)	89.19	< 0.001	Significativo

La tabla 9 muestra el porcentaje entre > 60% y < 10% representado por el alelo Mse1-CAC/EcoR1-ACA_12 obteniendo un $p < 0.001$ mostrando al grupo verde (San Miguel, Jiquilisco y Morazán) con una frecuencia alélica de 8%.

Tabla 9: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociados a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 60% y < 10%.

Alelos	Rojo % / (+/-)	Verde % / (+/-)	Azul % / (+/-)	χ^2	P	Significancia
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_12	71%/(30/12)	8%/(5/51)	76%/(39/12)	65.72	< 0.001	Significativo

En tabla 10 se puede observar el porcentaje entre > 50% y < 10%, encontrando 6 alelos con un $p < 0.001$, para Mse1-CAC/EcoR1-ACA_6, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_12, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_45, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51 y Mse1-CAC/EcoR1-ACA_76, Mse1-CAC/EcoR1-ACA_83. Estos alelos presentan una asociación genética entre ellos.

Tabla 10: Resultados de frecuencias alélicas de tres grupos asociados a un polimorfismo de longitud de fragmento amplificados utilizando la presencia y ausencia de cada individuo entre > 50% y < 10%.

Alelos	Rojo % / (+/-)	Verde % / (+/-)	Azul % / (+/-)	X ²	P	Significancia
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_6	52%/(22/20)	10%/(6/50)	50%/(26/25)	28.76	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_12	71%/(30/12)	8%/(5/51)	76%/(39/12)	65.72	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_45	54%/(23/19)	10%/(6/50)	82%/(42/9)	52.22	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_51	88%/(37/5)	7%/(4/52)	96%/(49/2)	116.16	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_76	73%/(31/11)	8%/(5/51)	68%/(35/16)	89.19	< 0.001	Significativo
Mse1-CAC/EcoR1-ACA_83	52%/(22/20)	5%/(3/53)	72%/(37/14)	59.51	< 0.001	Significativo

4.2.5 Estimación del índice de fijación F_{ST}

En la diagonal inferior de la tabla 11 se muestran los resultados de los valores de (F_{ST}) que mide el grado de diferenciación genética entre poblaciones. El valor F_{ST} más alto se localizó entre las poblaciones de San Miguel y Sonsonate F_{ST} 0.106. Otro valor que se encontró alto fue entre las poblaciones San Miguel y San Ignacio F_{ST} 0.092. Las poblaciones que mostraron menos divergencia genética fueron las de San Miguel y Jiquilisco F_{ST} 0.030.

Tabla 11: Matriz de distancia genética de las 6 poblaciones utilizando el programa Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Nei con el fin de obtener los valores de (F_{ST}).

	Sonsonate	San Salvador	San Ignacio	Jiquilisco	San Miguel	Morazán
Sonsonate	0.000000					
San Salvador	0.043639	0.000000				
San Ignacio	0.059640	0.038752	0.000000			
Jiquilisco	0.065396	0.042843	0.049683	0.000000		
San Miguel	0.106278	0.079513	0.092528	0.030061	0.000000	
Morazán	0.054930	0.048503	0.048994	0.036404	0.073562	0.000000

Los valores utilizados para el índice de fijación se originaron con el programa Structure teniendo en cuenta los 3 agrupamientos genéticos. El grupo rojo está conformado por 42 individuos representando las poblaciones de Sonsonate, San Salvador, San Ignacio y Morazán, el grupo verde con 56 individuos representando las poblaciones de San Miguel, Jiquilisco y Morazán, y el grupo azul con 51 individuos conformado por las poblaciones de Sonsonate, San Salvador, San Ignacio, Morazán y Jiquilisco.

La tabla 12 confirma una diferenciación genética entre el grupo verde y azul F_{ST} 0.082, mientras que el color verde y rojo presenta F_{ST} 0.058, mostrando la menor divergencia genética entre los colores azul y rojo F_{ST} 0.033.

Tabla 12: Matriz de distancia genética de los tres grupos genéticos utilizando el programa Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Nei con el fin de obtener los valores de (F_{ST}).

	Rojo	Verde	Azul
Rojo	0.000000		
Verde	0.058830	0.000000	
Azul	0.033701	0.082878	0.000000

El análisis de F_{ST} opción distancia de Reynolds, muestra un resultado similar al obtenido con Nei (ver tabla 13), la población de San Miguel y Sonsonate con F_{ST} 0.281, así mismo se encontró un valor alto entre las poblaciones San Miguel y San Ignacio F_{ST} 0.280, las poblaciones que mostraron menor divergencia genética fueron las de San Miguel y Jiquilisco con un F_{ST} 0.104.

Tabla 13: Matriz de distancia genética de las 6 poblaciones utilizando el programa Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Reynolds con el fin de obtener los valores de (F_{ST}).

	Sonsonate	San salvador	San Ignacio	Jiquilisco	San Miguel	Morazán
Sonsonate	0.000000					
San salvador	0.132333	0.000000				
San Ignacio	0.174486	0.133164	0.000000			
Jiquilisco	0.168811	0.130127	0.150317	0.000000		
San Miguel	0.281080	0.247898	0.280623	0.104577	0.000000	
Morazán	0.145081	0.143180	0.147366	0.101795	0.214248	0.000000

Los valores obtenidos para los tres grupos genéticos. Confirman una diferenciación genética entre el grupo azul y verde F_{ST} 0.215, mientras que el grupo verde y rojo presenta F_{ST} 0.182, la menor divergencia genética se encuentra en los grupos azul y rojo F_{ST} 0.098 (ver tabla 14), con la diferencia que se utilizó la opción de distancia de Reynolds.

Tabla 14: Matriz de distancia genética de los tres grupos genéticos utilizando el programa Philip 3.65, el subprograma Gendist en la opción distancia de Reynolds con el fin de obtener los valores de (F_{ST}).

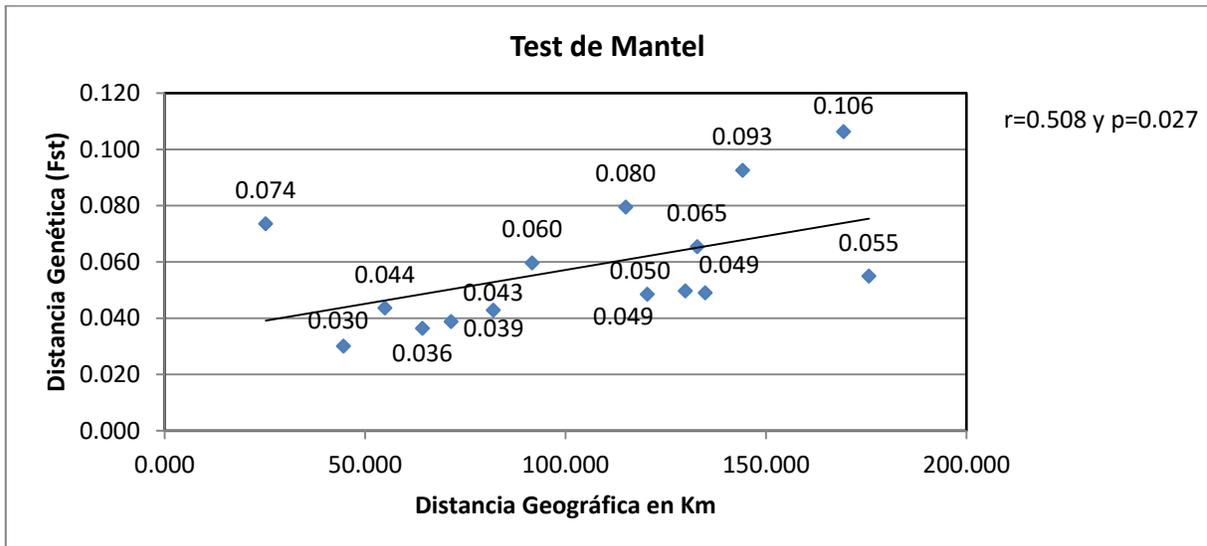
	Rojo	Verde	Azul
Rojo	0.000000		
Verde	0.182009	0.000000	
Azul	0.098273	0.215915	0.000000

4.2.6 Aislamiento por distancias

En la tabla 11 y 15 se puede observar una matriz de distancia geográfica y una matriz de distancia genética las cuales se utilizaron para el análisis de distancia. La gráfica 10 muestran los puntos por pares de valores de distancia genética (F_{ST}) y geográfica (km) entre las poblaciones, mostrando un correlación positiva, con un valor de $r = 0.508$ y $P = 0.027$. Estos resultados sugieren que la especie estudiada presenta un aislamiento por distancia

Tabla 15: Matriz de distancia geográfica en km de las 6 poblaciones por medio de Google Earth 2015.

Distancia geográfica entre las 6 poblaciones (Km)						
	Sonsonate	San Salvador	San Ignacio	Jiquilisco	San Miguel	Morazán
Sonsonate	0					
San Salvador	54.95	0				
San Ignacio	91.69	71.47	0			
Jiquilisco	132.85	81.98	129.88	0		
San Miguel	169.36	115.01	144.16	44.62	0	
Morazán	175.69	120.4	134.85	64.33	25.21	0



Gráfica 10: Análisis de correlación entre Distancia Geográfica (Km) y Distancia Genética entre las 6 poblaciones de *Aedes aegypti*. Se observa claramente una relación entre las variables. Se utilizó el programa GenAlex Versión 6.5 (Peakall y Smouse 2012).

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La variabilidad genética que se observó en poblaciones de *Aedes aegypti*, se basó en el análisis del árbol filogenético del algoritmo neighbour-joining (Saitou y Nei 1987), el análisis de Estructura Poblacional según Pritchard *et al.* (2000), el Análisis de la frecuencia alélica por el método de chi cuadrado, el Índice de fijación (F_{ST}) utilizando el estimador de Nei (1972), Reynolds *et al.* (1983) y un análisis de Aislamiento por distancia según Mantel (1967).

Estos análisis, revelan una variabilidad genética entre las poblaciones de San Miguel, San Ignacio y Sonsonate, observándose como resultado tres grupos genéticamente divergentes. Dicha variabilidad genética podría ser explicada según diferencias de algunos factores climáticos como la temperatura y humedad relativa que caracterizan a cada una de las localidades en el estudio; además de factores antropogénicos como el uso de insecticidas sintéticos para la erradicación de las poblaciones de larvas (temephos) y adultos (deltametrina) de este mosquito como parte de las campañas del Ministerio de Salud (MINSAL) para el control de enfermedades como el Dengue y más recientemente Chikungunya y Zika. Además, deben ser considerados los índices larvarios de este mosquito reportados para dichas localidades, como indicador del tamaño de la población, que es un determinante de la divergencia genética (Anexo 5).

En cuanto al efecto de los factores climáticos, según algunos autores, estos favorecen la variabilidad genética de *Aedes aegypti* (Campos *et al.* 2012, Caldera *et al.* 2013). Así mismo, Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2000) indica que las poblaciones que viven en hábitats aislados o extremos pueden alterar su composición genética. Dicho lo anterior, resulta evidente la divergencia genética encontrada entre las localidades de San Ignacio, San Miguel y Sonsonate; así mismo las variaciones de temperatura entre estos sitios es evidente en la gráfica de temperaturas máximas absolutas (anexo 6), los valores promedio reportados por la Dirección General del Observatorio Ambiental (DGOA) durante los últimos 10 años entre los meses de noviembre a enero van de 20.09°C para San Ignacio, de 32.95°C para Sonsonate y de 37.16°C para San Miguel, entre los meses de febrero a octubre

las temperaturas máximas absolutas van de 22.31°C para San Ignacio, de 35.04°C para la localidad de Sonsonate de y 38.64°C para San Miguel.

Por esta razón las poblaciones pertenecientes a las áreas secas como la costa, también son diferentes de aquellas áreas con elevaciones de 1044 msnm como el municipio de San Ignacio. Probablemente esta es la razón por la cual las poblaciones de *Aedes aegypti* presentes en San Miguel y Jiquilisco, son caracterizadas por presentar temperaturas muy similares (anexo 7), que con el resto de las otras localidades del estudio.

Según lo expresado por Tabachnick y Powell (1979), no solo los factores ambientales, sino también los factores humanos han provocado poblaciones polimórficas de *Aedes aegypti* a nivel genético. En este sentido, los resultados del análisis de frecuencias alélicas presentan diferencias significativa entre las poblaciones estudiadas así como entre los grupos rojo 100%, verde 8% y azul con 68% mostrando las frecuencias alélicas (tabla 8), la variabilidad genética de *Aedes aegypti* en las localidades se debería a consecuencia de las variaciones de la temperatura ambiental y humedad relativa, además estaría explicada por otros factores de origen humano, como el tamaño de la población humana que condiciona directamente el tamaño de las poblaciones de *Aedes aegypti*, que es significativamente más pequeña para la localidad de San Ignacio comparada con el resto de localidades (figura 5). Estos resultados son coherentes con investigaciones similares (Paupy *et al.* 2008, Paupy *et al.* 2010, Campos *et al.* 2012). Donde ponen de manifiesto que las condiciones climáticas y la población humana, favorecen la variabilidad genética del vector.

Al respecto, Wright (1969) menciona que cuando la población mantiene un tamaño pequeño durante un largo periodo de tiempo, se produce una erosión gradual de la variabilidad genética al interior de esa población, por un proceso conocido como deriva genética, favoreciendo la fijación de alelos que tienen mayor frecuencia en la población y eliminando aquellos con menor frecuencia, Esto explicaría la divergencia genética entre San Ignacio (grupo rojo) y otras poblaciones.

Los valores F_{ST} según la distancia opción de Reynolds, mostraron claramente diferencias genéticas de moderadas a muy altas entre todas las poblaciones de las localidades en estudio, para San Miguel y Sonsonate presento un $F_{ST} = 0.281$, para San Miguel y San Ignacio un $F_{ST} = 0.280$, mientras que para San Miguel y Jiquilisco mostró un $F_{ST} = 0.104$; donde la distancia fue menor. Dicho lo anterior, las poblaciones de *Aedes aegypti* son altamente diferenciadas, debido a que el flujo genético es reducido. Además es importante destacar que los valores más bajos de F_{ST} entre las poblaciones de San Miguel y Jiquilisco indican un flujo génico mayor, y por lo tanto menor diferencias genéticas entre estas poblaciones de insectos, que a su vez concuerda con la similitud de las condiciones ambientales que caracterizan estas localidades.

Estas diferencias genéticas entre las poblaciones de las localidades evaluadas, concuerdan con los resultados representados por los valores F_{ST} encontrados entre el grupo verde y los grupos rojo y azul (tabla 14), con valores F_{ST} 0.182 y 0.215 respectivamente. Nos encontramos nuevamente con una diferencia genética fuertemente marcada entre los individuos pertenecientes a las localidades de San Miguel y Jiquilisco respecto del resto de localidades y una mayor similitud entre los grupos rojo y azul con un valor F_{ST} de 0.098, y por consiguiente un mayor flujo genético entre los municipios de San Salvador, Morazán, Sonsonate y San Ignacio. Es importante destacar que el análisis de distancia opción Nei, presentó un patrón similar (ver tabla 12) con los valores de la opción de Reynolds. Esto concuerda con Apostol *et al.* (1996), analizó la estructura genética del mosquito *Aedes aegypti* en Puerto Rico de tres maneras diferentes de distancia genética (F_{ST}), donde los promedios fueron similares en los tres métodos, utilizando en su estudio con el marcador genético de RAPD.

Cáceres y León 2007 encontraron dos poblaciones genéticamente diferentes en Perú explicadas por una dispersión limitada del mosquito a causa de barreras geográficas, razones que podrían también explicar la diferencia genética entre las localidades de San Miguel y Jiquilisco y el resto de localidades. La variabilidad genética depende en gran parte a la cantidad de comercio y transporte humano.

Usando marcadores microsatélites Huber *et al* 2004, estimaron la diferencia génica de *Aedes aegypti* en Cambodia, Tailandia y en el Sur de Vietnam. Dichos análisis ($F_{st} = 0.117$) han sugerido una migración pasiva del mosquito vector a través de la ayuda humana la cual explica los patrones de diferenciación. El transporte humano de huevos, larvas y adultos en contenedores a través de rutas comerciales podría originar poblaciones geográficamente distantes pero genéticamente similares.

Así mismo, debe considerarse la correlación entre la distancia geográfica (km) y la distancia genética (F_{ST}), pues de existir una correlación significativa entre estas, existen entonces evidencias de aislamiento por distancia (Slatkin 1994, Rousset 2001), lo cual explicaría desde otro punto de vista las diferencias genéticas encontradas entre las localidades de este estudio, así como las similitudes genéticas entre las poblaciones de San Miguel y Jiquilisco.

A partir del test de Mantel (Gráfica 10), se puede indicar evidencias de un proceso de aislamiento por distancia con un valor de $r = 0.508$ y un p valor significativo de 0.027. Estos resultados muestran una relación directamente proporcional entre la distancia geográfica y la distancia genética, por cuanto que a mayor distancia geográfica mayor es la distancia genética entre las poblaciones evaluadas en este estudio y viceversa. Resulta evidente entonces, que los resultados genéticos entre las poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas son consecuencia directa de la distancia geográfica entre ellas, lo cual concuerda con lo reportado por Aitken T *et al.* (1977), quienes mencionan que la divergencia genética de las especies con frecuencia están asociadas a la distribución geográfica, dando origen a la aparición de poblaciones genéticamente divergentes. Al respecto, otros autores reportan que las barreras geográficas posiblemente originan variabilidad genética en las poblaciones de *Aedes aegypti* (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2002, Cáceres y León 2007). De la misma manera coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Según Pasteur *et al.* 1995, Lehmann *et al.* 1996, Failloux *et al.* 1997, quienes concuerdan con el hecho que la variabilidad genética depende del transporte humano, que ha sido considerado responsable de la dispersión y el intercambio genético entre poblaciones de este mosquito. Esto explicaría la variabilidad genética encontrada en las localidades del presente estudio debido a los factores antropogénicos de la misma manera, Endersby (2009) estudio la estructura genética del vector en Australia y Vietnam, el cual mostro un aislamiento por distancia para las poblaciones de *Aedes aegypti*. Por el contrario Twerdochlib *et al.* (2012) realizó un estudio de variabilidad genética de mosquito con el gen ND4 en Brazil, mostrando valores de $r = -0.1216$ y $P = 0.7550$ indicando que no hay una correlación significativa entre la distancia genética y geográfica.

La capacidad para el desarrollo de la resistencia a insecticidas como el temephos (larvicida) por parte de poblaciones naturales de *Aedes aegypti* de El Salvador (Ayala y Moreno 2011), debe ser considerada para explicar la heterogeneidad genética entre las poblaciones de *Aedes aegypti* evaluadas, en tanto que la presión que se ejerce con el insecticida sobre una población de insectos vectores dependerá de la frecuencia en el número de casos de la enfermedad transmitida, condicionado directamente por el tamaño de la población del vector, que a su vez está directamente relacionada al tamaño de la población humana. Nos encontramos entonces, frente a diferencias en la presión que se ejerce con los insecticidas (usados para el control de algunas enfermedades de importancia en salud pública) en las poblaciones de este mosquito de las diferentes áreas geográficas evaluadas, como un condicionante de la variabilidad genética encontrada en este estudio, lo que concuerda con lo reportado por otros autores, quienes mencionan que la presión con insecticidas es probablemente la principal causa de la diversidad genética del mosquito *Aedes aegypti* en zonas urbanas (Ocampo y Wesson 2004, Ayres *et al.* 2004).

VI. CONCLUSIÓN

Los análisis filogenéticos realizados generaron tres grupos genéticamente diferentes de *Aedes aegypti* en seis áreas geográficas de El Salvador, dentro de las cuales se evidenciaron poblaciones homogéneas y poblaciones heterogéneas, esto podría deberse a factores climáticos como la temperatura y humedad relativa que caracterizan a cada una de las localidades, además de factores de origen humanos, ya que el tamaño de la población humana condiciona el tamaño de las poblaciones del mosquito vector, favoreciendo la fijación de alelos en poblaciones pequeñas confirmándose una divergencia genética entre San Ignacio y otras poblaciones, también esta variabilidad puede estar dada por la presión selectiva ejercida con insecticidas debido a los brotes epidemiológicos que presentan las localidades. Así mismo los valores de distancia genética baja, indicaron un flujo génico constante por lo tanto menor diferencia genética entre las poblaciones todo lo contrario para los valores altos que indicaron mayor diferencia genética presentando un flujo génico reducido, mostrando así una correlación directamente proporcional con respecto a la distancia genética y la distancia geográfica.

VII. RECOMENDACIÓN

- Se recomienda analizar individuos de *Aedes aegypti* de los departamentos restantes donde se encuentra el vector, para tener un panorama completo de la variabilidad genética del mosquito.
- Ejecutar estudios de ADN mitocondrial en poblaciones de *Aedes aegypti* para determinar con mayor precisión las rutas de migración de este vector en nuestro país.
- Realizar estudios de variabilidad genética y morfometría del mosquito transmisor del Dengue, Chikungunya y Zika en temporada seca y temporada lluviosa para determinar cómo se comporta la genética del mosquito en esas temporadas.
- Realizar estudios de comportamiento de posición en la forma de cómo se ubica al detenerse el mosquito en los lugares de preferencia como pared, tipo de material tanto dentro y fuera del domicilio que visita y otras preferencias, para saber si ha cambiado su conducta o la mantiene.
- Se recomienda realizar estudios de variabilidad genética en zonas con altos índices epidemiológicos y comparar estas zonas de estudio con zonas con bajos índices epidemiológicos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIA

- Aitken, T. H., Downs, W. G., & Shope, R. E. (1977). *Aedes aegypti* strain fitness for yellow fever virus transmission. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 26(5 Pt 1), 985-989.
- Almirón, w. r. (2002). Culicidae (diptera) de la Provincia de Córdoba. Actualizaciones en Artropodología Sanitaria Argentina. Serie Enfermedades Transmisibles, 2: 97-106.
- Apostol, B. L., Black, I. V., William, C., Reiter, P., & Miller, B. R. (1996). Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 76(4).
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR´ s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review).
- Avise, J. C., & Hamrick, J. L. (1996). *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall.
- Ayala, F. J., & Kiger, J. A. (1984). *Genética moderna*. Omega. Barcelona.
- Ayala, R., & Moreno, M. (2011). Resistencia al temefos por presión de selección en una población de *Aedes aegypti* de El Salvador. 2(1): 1-9
- Ayres, C. F. J., Melo-Santos, M. A. V., Prota, J. R. M., Solé-Cava, A. M., Regis, L., & Furtado, A. F. (2004). Genetic structure of natural populations of *Aedes aegypti* at the micro-and macrogeographic levels in Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20(4), 350-356.

- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Bracco, J. E., Capurro, M. L., Lourenço-de-Oliveira, R., & Sallum, M. A. M. (2007). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5), 573-580.
- Cáceres OA., & León W. (2007). Variantes genéticas de *Aedes aegypti* y su asociación con el serotipo del virus dengue en un área endémica del Perú Lima: Instituto Nacional de Salud. Disponible en la red: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/cindoc/informes_tecnicos/96.pdf
- Cabrero J. & P.M., Camacho (2009). Fundamentos de poblaciones genéticas. Manual Soler, editor. Evolución la base de la biología. p. 83-488.
- Caldera, S. M., Jaramillo, M. C., Cochero, S., Pérez-Doria, A., & Bejarano, E. E. (2013). Diferencias genéticas entre poblaciones de *Aedes aegypti* de municipios del norte de Colombia, con baja y alta incidencia de dengue. *Biomédica*, 33, 89-98.
- Campos, M., Spenassatto, C., Lourdes da Graça Macoris, M., Paduan, K. D. S., Pinto, J., & Ribolla, P. E. M. (2012). Seasonal population dynamics and the genetic structure of the mosquito vector *Aedes aegypti* in Sao Paulo, Brazil. *Ecology and evolution*, 2(11), 2794-2802.
- CDC (Centro de control y prevención) (1995). Dengue Surveillance Summary. U.S. Department of Health and Human Services. Number 70, March: 4
- Chapman, R. F. (1998). *The insects: structure and function*. Cambridge university press.

- Colvard J. (1978). El comportamiento alimentario de los mosquitos. *Investigación y Ciencia*. Edición en español Scientific American, Núm. (23): 86-93.
- De Vicente, M. C. (2002). Molecular technique to facilitate prioritization of plant genetic resources conservation and further research. *AgBiotechNet*, 4 July, 1-5.
- Echenique, V, Rubinstein, C. & Mroginski, L. (2004). *Biotecnología y Mejoramiento vegetal*. Ediciones INTA. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. 424 p. <http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/biotec.htm-16k> [acceso el 9/10/2014]
- Endersby, N. M., Hoffmann, A. A., White, V. L., Lowenstein, S., Ritchie, S., Johnson, P. H., & Kittiyapong, P. (2009). Genetic structure of *Aedes aegypti* in Australia and Vietnam revealed by microsatellite and exon primed intron crossing markers suggests feasibility of local control options. *Journal of medical entomology*, 46(5), 1074-1083.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Failloux, A. B., Raymond, M., Ung, A., Chevillon, C., & Pasteur, N. (1997). Genetic differentiation associated with commercial traffic in the Polynesian mosquito, *Aedes polynesiensis* Marks 1951. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60(1), 107-118.
- Feldman S., Miriam B., & Carlos B. (2009). Dengue: Características de mosquito (vector) que trasmite del dengue. Facultad de Ciencias Agrarias UNR. Disponible en la red <http://www.facpce.org.ar/>

- Fernández, I.S. (2009). *Biología y Control de Aedes aegypti: Manual de Operaciones*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Embrapa-spi: Embrapa-Cenargen.
- Fosalud, (2012 -2015). *Guías de atención para enfermos de dengue*, El Salvador
<http://www.fosalud.gob.sv/phocadownload/Guia%20Dengue%20EI%20Salvador%202012-2015.pdf> [acceso el 5/05/2014]
- Futuyma, D. (1986). *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. 223-231 pp.
- Galtier, N., Depaulis, F., & Barton, N. H. (2000). Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. *Genetics*, 155(2), 981-987.
- Gorrochotegui-Escalante, N., Gomez-Machorro, C., Lozano-Fuentes, S., Fernandez-Salas, L., Muñoz, M. D. L., Farfan-Ale, J. A., & Black, W. C. (2002). Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66(2), 213-222.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics* (Vol. 116). Sunderland: Sinauer associates.
- Harwood, R.F. & M.T. James. (1987). *Entomología Médica y Veterinaria*. Primera Edición, LIMUSA, México: 201-203.
- Huber, K., Le Loan, L., Chantha, N., & Failloux, A. B. (2004). Human transportation influences *Aedes aegypti* gene flow in Southeast Asia. *Acta tropica*, 90(1), 23-29.

- Joyce, A. L., Bernal, J. S., Vinson, S. B., Hunt, R. E., Schulthess, F., & Medina, R. F. (2010). Geographic variation in male courtship acoustics and genetic divergence of populations of the *Cotesia flavipes* species complex. *Entomologia experimentalis et applicata*, 137(2), 153-164.
- Karp, A.; & Edwards, K. (1998). DNA markers: a global overview. In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- Lehmann, T., Hawley, W. A., Kamau, L., Fontenille, D., Simard, F., & Collins, F. H. (1996). Genetic differentiation of *Anopheles gambiae* populations from East and West Africa: comparison of microsatellite and allozyme loci. *Heredity*, 77(2), 192-200.
- López, C. (2002). Marcadores Moleculares: Curso de Genética molecular. Departamento de Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27(2 Part 1), 209-220.
- Martínez, F. C. (1987). Los Mosquitos de México (Diptera: Culicidae) Taxonomía, Distribución Geográfica y su importancia en Salud Pública. Tesis UNAM Facultad de Ciencias: 198.
- MINSAL (Ministerio de Salud Argentina) (2009). Enfermedades infecciosas Guía para el equipo de salud Nro. 2. Dirección de Epidemiología. Disponible en la red: <http://www.msal.gov.ar/htm/site/pdf/guia-dengue.pdf> [acceso el 10/05/2014]

- MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2012). Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo San Salvador. Plan Nacional de Implementación del Convenio de Estocolmo El Salvador. Disponible en la red: <http://www.marn.gob.sv> [acceso el 5/05/2014]
- MINSAL (Ministerio de Salud) (2007). Normas técnicas de prevención y control del dengue.
- Nei M. (1972). Genetic distances between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nelson, M.J. (1986). *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC. 50 pp.
- Ocampo, C. B., & Wesson, D. M. (2004). Population dynamics of *Aedes aegypti* from a dengue hyperendemic urban setting in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(4), 506-513.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2011a). Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas. Biblioteca Sede OPS - Catalogación en la fuente. Washington, D.C.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2011b). Enfermedades transmitidas por vectores. Disponible en la red: <http://www.salud.gob.do/download/docs/Dengue.pdf> [acceso el 17/06/2015]
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2015). Síndrome neurológico, anomalías congénitas e infección por virus zika implicaciones para la salud publica en las Américas

- Orell, M., Lahti, K., Koivula, K., & WELLING, P. (1999). Immigration and gene flow in a northern willow tit (*Parus montanus*) population. *J. Evol. Biol*, 1(2), 283-295.
- Pasteur, N., Marquine, M., Rousset, F., Failloux, A. B., Chevillon, C., & Raymond, M. (1995). The role of passive migration in the dispersal of resistance genes in *Culex pipiens quinquefasciatus* within French Polynesia. *Genetical research*, 66(2), 139-146.
- Paupy, C., Brengues, C., Kamgang, B., Hervé, J. P., Fontenille, D., & Simard, F. (2008). Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *Journal of medical entomology*, 45(3), 391-400.
- Paupy, C., Brengues, C., Ndiath, O., Toty, C., Hervé, J. P., & Simard, F. (2010). Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(4), 473-480.
- Pratt, H.D., R.F. Darsie.: & Litting. (1976). Mosquitoes of public health importance and their control. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta Georgia. p 18.
- Peakall, R. & Smouse P. E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Reynolds, J., Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1983). Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105(3), 767-779.

- Rivas, A.C, & M.L. Zavaleta. (1997). Utilización del *Bacillusthuringiensis* como un controlador biológico en *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias y Matemática, Universidad de el Salvador. (tesis de licenciatura), 56pp.
- Romero C., Delfino M., Giachetto G. & Pérez M. (2011). Dengue: frente a una eventual epidemia en Uruguay. Puesta al día. *Clínicas Pediátricas del Sur*. 28-39.
- Rousset, F. (2001). Inferences from spatial population genetics, en D.J. Baldwin, M. Bishop y L. Cannings (eds.), *Handbook of statistical genetics*. John Wiley, Nueva York, pp. 239-270.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sistema información de dengue (2013). Unidad de estadística e información de salud del ministerio de salud.
- Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure, en L.A. Real (ed.), *Ecological genetics*, Princeton University Press, Princeton, pp. 3-18.
- Structure Harvester web: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/> [acceso el 28/11/2015]
- Tabachnick WJ & Powell JR. (1979). A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genet Resource Crop Evolution*. 34:215-29.
- Thirión I., J. (2003). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México, Bayer environmental science, Bayer de México, S.A. de C.V. p. 3-151. <http://www.proteccionambiental.com.ar/%5CpdfPlagas%5Clibro-j-Thirio1.pdf>

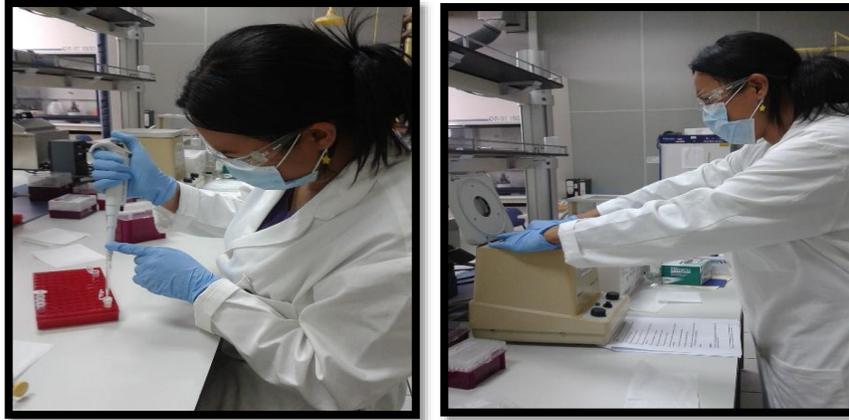
- Twerdochlib, A. L., Bonna, A. C. D., Leite, S. S., Chitolina, R. F., Westphal, B., & Navarro-Silva, M. A. (2012). Genetic variability of a population of *Aedes aegypti* from Paraná, Brazil, using the mitochondrial ND4 gene. *Revista Brasileira de Entomologia*, 56(2), 249-256.
- Van Benthem, B. H. B., Khantikul, N., Panart, K., Kessels, P. J., Somboon, P., & Oskam, L. (2002). Knowledge and use of prevention measures related to dengue in northern Thailand. *Tropical Medicine & International Health*, 7(11), 993-1000.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Williams, R.E. Bennet, G.W. & Hill, C. (2010). Mosquitoes in and around the home. *Purdue Extension E-26-W*.
- Wolfe, A.D. & A. Liston. (1998). Contributions of PCR-Based methods to plant systematics and evolutionary biology 43-86. En Soltis, D. E., P. M. Soltis y J. J. Doyle (eds.). *Molecular systematics of plants II DNA sequencing*. New York. Kluwer Academic Publishers.
- Wright, S. (1969). *Evolution and Genetics of Populations*, vol.2, The theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago.

IX. ANEXOS

Anexo 1: Hoja de datos de los individuos utilizados en el presente estudio.

# De Muestras	Nombre del sitio	Departamento	Municipio	Fecha de Colecta	Deposito de colecta	Latitud	Longitud
A. aegypti. 1-5	Colonia el carmen	Sonsonate	Sonsonate	18 de agosto del 2014	Larvas en Pila	13°43'40.58"N	89°44'1.40"O
A. aegypti. 6-10	Colonia el carmen	Sonsonate	Sonsonate	18 de agosto del 2014	Larvas en Pila	13°43'42.55"N	89°44'6.11"O
A. aegypti. 11-15	Colonia el carmen	Sonsonate	Sonsonate	18 de agosto del 2014	Larvas en Pila	13°43'43.17"N	89°44'6.94"O
A. aegypti. 16-19	Colonia san antonio	Sonsonate	Sonsonate	18 de agosto del 2014	Larvas en Pila	13°43'40.11"N	89°44'5.17"O
A. aegypti. 20-22	Colonia san antonio	Sonsonate	Sonsonate	18 de agosto del 2014	Larvas en Pila	13°43'38.62"N	89°44'4.89"O
A. aegypti. 23-24	Colonia san antonio	Sonsonate	Sonsonate	18 de agosto del 2014	Larvas en Pila	13°43'36.17"N	89°44'6.39"O
A. aegypti. 1-3	Colonia la fosa	San Salvador	San Salvador	9 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°43'14.42"N	89°11'55.67"O
A. aegypti. 4-5	Colonia la fosa	San Salvador	San Salvador	9 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°43'14.70"N	89°11'56.97"O
A. aegypti. 6-9	Colonia la fosa	San Salvador	San Salvador	9 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°43'14.87"N	89°11'55.42"O
A. aegypti. 10-11-13	Colonia la fosa	San Salvador	San Salvador	9 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°43'13.69"N	89°11'56.24"O
A. aegypti. 14-16	Colonia la fosa	San Salvador	San Salvador	9 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°43'14.03"N	89°11'52.76"O
A. aegypti. 17-19	Colonia la fosa	San Salvador	San Salvador	9 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°43'11.65"N	89°11'55.52"O
A. aegypti. 20-22	Barrio san jacinto	San Salvador	San Salvador	16 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°41'3.32"N	89°10'48.41"O
A. aegypti. 23	Barrio san jacinto	San Salvador	San Salvador	16 de mayo del 2014	Larvas en barriles	13°41'5.44"N	89°10'46.94"O
A. aegypti. 1-2-4-5	La villa	Chalatenango	San Ignacio	29 de agosto del 2014	Larvas en Barriles	14°20'21.11"N	89°10'44.58"O
A. aegypti. 6-10	La villa	Chalatenango	San Ignacio	29 de agosto del 2014	Larvas en Barriles	14°20'19.69"N	89°10'44.58"O
A. aegypti. 11-13	La villa	Chalatenango	San Ignacio	29 de agosto del 2014	Larvas en Pilas	14°20'19.01"N	89°10'43.75"O
A. aegypti. 14-18	La villa	Chalatenango	San Ignacio	29 de agosto del 2014	Larvas en Pilas	14°20'22.01"N	89°10'42.58"O
A. aegypti. 19-23	La villa	Chalatenango	San Ignacio	29 de agosto del 2014	Larvas en Pilas	14°20'17.69"N	89°10'40.87"O
A. aegypti. 24	La villa	Chalatenango	San Ignacio	29 de agosto del 2014	Larvas en Pilas	14°20'18.52"N	89°10'39.35"O
A. aegypti. 1-3	Colonia las flores	Usulután	Jiquilisco	5 de Junio del 2014	Larvas en Pila	13°19'33.88"N	88°34'18.50"O
A. aegypti. 4-6	La Siembras	Usulután	Jiquilisco	5 de Junio del 2014	Larvas en Pila	13°19'32.11"N	88°34'16.48"O
A. aegypti. 7-10	La Siembras	Usulután	Jiquilisco	5 de Junio del 2014	Larvas en Pila	13°20'8.87"N	88°34'21.86"O
A. aegypti. 11-14	La Siembras	Usulután	Jiquilisco	5 de Junio del 2014	Larvas en Pila	13°20'11.69"N	88°34'22.42"O
A. aegypti. 15-17	Colonia las flores	Usulután	Jiquilisco	5 de Junio del 2014	Larvas en Pila	13°19'37.89"N	88°34'12.80"O
A. aegypti. 18-21	Colonia las flores	Usulután	Jiquilisco	5 de Junio del 2014	Larvas en Pila	13°19'37.51"N	88°34'6.99"O
A. aegypti. 22-24	Colonia las flores	Usulután	Jiquilisco	5 de Junio del 2014	Larvas en Pila	13°19'37.54"N	88°34'6.96"O
A. aegypti. 1-4	Colonia las Americas	San Miguel	San Miguel	5 de junio del 2014	Larvas en Pila	13°28'41.55"N	88°10'19.34"O
A. aegypti. 5-12	Colonia las Americas	San Miguel	San Miguel	5 de junio del 2014	Larvas en Pila	13°28'40.85"N	88°10'22.68"O
A. aegypti. 13-17	Colonia las Americas	San Miguel	San Miguel	5 de junio del 2014	Larvas en Pila	13°28'42.19"N	88°10'22.82"O
A. aegypti. 18-23	Colonia las Americas	San Miguel	San Miguel	5 de junio del 2014	Larvas en Pila	13°28'40.76"N	88°10'20.14"O
A. aegypti. 24	Colonia las Americas	San Miguel	San Miguel	5 de junio del 2014	Larvas en Pila	13°28'43.33"N	88°10'18.23"O
A. aegypti. 1-3	Colonia morazán	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°41'7.87"N	88° 5'54.10"O
A. aegypti. 4-10	Colonia morazán	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°41'7.30"N	88° 5'53.84"O
A. aegypti. 11-14	Colonia morazán	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°41'8.19"N	88° 5'56.27"O
A. aegypti. 15-17	Colonia san José	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°40'54.08"N	88° 5'59.03"O
A. aegypti. 18-19	Colonia san José	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°40'54.51"N	88° 5'58.76"O
A. aegypti. 20-22	Colonia san José	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°40'54.84"N	88° 6'0.29"O
A. aegypti. 25	Colonia san José	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°40'52.35"N	88° 6'3.14"O
A. aegypti. 27	Colonia san José	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°40'51.41"N	88° 6'3.80"O
A. aegypti. 29	Colonia san José	Morazán	Morazán	27 de Julio del 2014	Larvas en Pila	13°40'51.41"N	88° 6'3.80"O

Anexo 2: Extracción de ADN genómico de las muestras de *Aedes aegypti*



Anexo 3: Midiendo la cantidad de ADN de las muestras.



Anexo 4: Muestras empacadas para ser transportadas a la Universidad Berkeley, Departamento de Biología Celular y Molecular



Anexo 5: índices larvarios de las 6 localidades del estudio de los últimos 5 años del 2010 al 2015 (fuente: Departamento de vectores, MINSAL).

Municipio	nov-09			dic-09			ene-10			feb-10		
	Casa	Depósito	Breteau									
Sonsonate	5.2	2.4	9.9	7.7	2.4	9.6	5.9	2.1	8.9	11.2	3.6	13.6
San Ignacio	6.7	1.6	7.5	3.9	1.2	5.1	2.1	0.5	2.4	5.5	1.6	7.4
San Miguel	1.2	2.8	3.3	11.3	5.1	23.9	9.6	4.1	21.8	7.8	4.4	18.3
San Salvador							0	0	0	0	0	0
Jiquilisco	21.7	7.2	31.8	21.7	7.2	31.8	24.8	6.8	25.5	12.5	4.0	18.7
San Francisco Gotera (Morazán)	11.0	2.5	19.4	11.0	2.5	19.4	10.0	3.4	23.4	12.8	4.3	32.0

mar-10			abr-10			may-10			jun-10		
Casa	Depósito	Breteau									
16.0	4.3	26.4	8.8	2.4	13.1	6.4	2.2	11.8	9.9	3.5	18.6
0.0	0.0	0.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.3	2.6	10.2	8.6	3.6	11.9	11.1	4.8	14.9	15.2	10.8	55.6
15.31	11.34	26.75	12.25	4.72	13.53	12.25	4.72	13.53	12.34	7	15.3
9.8	3.4	11.7	11.7	3.8	14.3	12.6	2.6	14.3	30.0	9.6	46.6
4.9	1.1	5.3	5.54	1.13	5.88	7.32	2.21	11.98	9.4	2.2	13.8

jul-10			ago-10			sep-10			oct-10		
Casa	Depósito	Breteau									
13.26	7.77	27.4	9.81	3.14	15.33	9.1	3.32	14.92	10.92	4.79	21.84
0	0	0	4.24	0.97	5.45	4.98	1.03	5.3	3	0.42	3
18.85	8.12	34.1	12.79	4.76	17.36	12.93	4.23	21.25	12.68	5.92	24.5
14.67	8.98	16.49	18.64	6.32	18.64	19.31	7.5	25.13	17.22	4.9	20
20.02	7.2	33.88	20.53	7.39	33.19	16.44	5	21.42	8.44	1.99	9.27
9.37	2.3	13.9	10.02	2.4	14.29	9.05	2.61	16.64	8.27	1.62	10.57

nov-10			dic-10			ene-11			feb-11		
Casa	Depósito	Breteau									
5.5	2.24	10.54	7.25	2.69	11.75	10.4	3.1	14.3	6.6	2.2	11.6
0	0	0	7.11	0.27	0.95	0.0	0.0	0.0	2.0	0.4	2.7
10.65	4.72	16.17	13.07	4.47	18.55	12.5	5.4	18.3	11.6	4.5	16.1
8	2.13	8	18.21	4.09	18.4	12.87	3.68	14.36	29.42	11.22	30.92
9.23	2.49	9.57	6.12	1.92	5.94	28.2	7.5	28.8	13.1	3.9	16.2
6.74	1.31	9.65	6.39	1.26	7.91	7.3	1.3	8.1	8.0	1.8	10.0

mar-11			abr-11			may-11			jun-11		
Casa	Depòsito	Breteau	Casa	Casa	Casa	Casa	deposito	Breteau	Casa	deposito	Breteau
9.8	3.1	16.0	9.1	2.7	13.8	9.3	3.1	15.9	12.4	4.4	21.8
3.0	0.7	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.5	2.3	10.3
12.6	3.5	12.4	10.4	3.6	13.6	14.7	5.6	21.3	16.4	7.9	41.6
7.14	18.32	85.71	19.9	10.82	24.61	28.17	9.46	35.21	27.72	10.1	32.18
12.1	4.3	14.6	13.6	4.4	16.5	15.6	4.1	19.9	23.6	7.7	36.6
8.0	1.5	8.0	7.5	1.8	8.9	7.2	2.0	10.7	9.8	2.2	13.1

jul-11			ago-11			sep-11			oct-11		
Casa	Deposito	Breteau									
17.1	5.4	26.6	14.9	6.6	27.7	16.7	7.5	30.0	23.2	8.3	36.9
5.0	0.8	5.3	4.3	0.8	6.1	6.0	1.5	7.6	5.6	0.8	5.6
18.5	6.3	26.0	15.5	5.7	24.8	17.5	7.3	30.0	14.9	7.8	40.6
30.43	7.25	39.13	23.07	10.84	27.14	32.66	8.74	39.2	19.88	11.03	34.78
25.6	11.2	47.7	22.0	5.4	25.0	38.0	15.9	88.1	35.0	10.9	81.5
9.1	2.0	11.4	11.2	2.5	13.6	7.4	1.8	9.1	13.7	2.9	18.3

nov-11			dic-11			ene-12			feb-12		
Casa	Deposito	Breteau									
24.5	9.3	42.6	12.4	5.0	18.2	16.5	5.2	23.1	17.5	5.2	24.8
0.0	0.0	0.0	6.7	1.4	6.7	0.0	0.4	1.7	1.6	0.5	3.2
12.2	4.0	17.3	9.7	3.5	11.9	8.5	2.9	10.2	13.3	4.5	17.6
21.68	11.2	27.16	17.62	5.6	20.76	21.66	10.09	34.21	22.3	9.21	24.71
21.9	7.9	39.3	16.5	4.1	16.5	22.0	7.3	26.6	17.0	5.2	19.1
9.6	1.9	11.6	5.7	1.2	6.7	6.1	1.4	6.6	6.1	1.4	6.9

mar-12			abr-12			may-12			jun-12		
Casa	Deposito	Breteau									
18.2	5.9	25.5	15.03	5.31	24.04	13.2	4.9	27.6	10.1	3.9	13.6
1.1	0.3	1.4	0	0	0	1.0	0.3	1.7	0.0	0.0	0.0
12.4	4.1	16.7	14.35	3.62	19.89	16.5	5.5	28.6	19.4	6.4	36.5
18.87	7.57	23.18	21.04	7.13	24.9	17.67	6.61	22.23	19.74	10	24.18
18.6	6.2	21.9	20.04	5.9	24.43	21.4	5.7	25.3	33.1	10.6	59.2
7.7	1.8	8.1	8.52	2.36	11.25	9.5	2.1	11.3	10.0	1.9	11.5

jul-12			ago-12			sep-12			oct-12		
Casa	Deposito	Breteau									
6.6	2.4	10.6	11.8	2.9	17.3	23.8	6.2	47.8	17.7	6.0	39.4
5.7	1.2	5.7	6.6	0.8	6.6	9.7	1.8	10.7	6.3	1.4	6.3
12.2	5.1	22.7	14.4	6.8	28.5	15.2	5.8	27.6	11.6	3.8	21.6
18.38	10.07	23.75	18.2	9.43	28.65	16.76	9.07	28.97	21.3	9.91	30.89
20.4	5.0	28.4	21.7	6.4	31.9	31.3	9.7	68.3	25.1	7.5	47.5
7.4	2.0	13.2	8.9	1.9	12.0	9.0	2.2	11.7	6.2	1.4	8.1

nov-12			dic-12			ene-13			feb-13		
Casa	Deposito	Breteau									
6.83	1.45	8.29	6.7	2.9	12.9	6.4	1.9	10.4	3.7	1.2	7.0
0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.2	0.9	0.0	0.0	0.0
13.16	4.36	16.45	10.8	4.0	13.1	10.8	5.5	15.2	8.8	3.0	11.1
15.61	6.96	18.58	16	6.72	21.87	15.84	9	22.41	17.29	9.54	25.21
14.78	3.69	18.76	13.8	3.4	16.4	16.4	5.2	19.8	13.9	4.4	19.9
6.33	1.21	7.73	7.3	1.4	8.1	6.9	1.4	8.2	7.7	1.4	8.5

mar-13			abr-13			may-13			jun-13		
Casa	Deposito	Breteau									
9.1	2.6	11.7	5.4	2.4	10.0	13.35	4.05	22.68	14.35	4.33	25.39
1.2	0.3	1.2	1.8	0.4	1.8	0.43	0.12	0.43	0.74	0.15	0.74
10.1	5.2	23.3	12.6	5.4	18.6	14.45	4.56	20.9	14.8	5.48	22.52
16.35	9.76	19.96	17.5	9.41	21.19	17.85	8.94	22.13	21.35	10.32	30.58
14.0	4.8	17.8	14.8	5.1	17.0	18.4	6.04	24.03	16.16	5.5	21.94
4.1	1.2	5.6	6.2	1.4	7.1	4.54	1.09	5.78	9.75	2.28	12.46

jul-13			ago-13			sep-13			oct-13		
Casa	Deposito	Breteau									
20.64	7.46	41.7	19.15	4.01	26.81	17.69	3.98	27.04	15.89	5.21	33.32
2.45	0.65	2.62	1.4	0.36	1.6	1.43	0.24	1.43	1.71	0.38	1.71
14.75	5.84	22.02	11.57	4.7	16.44	18.16	5.48	22.29	14.46	5.49	21.44
20.06	8.94	30.43	17.46	8.19	22.25	17.13	5.84	21.84	17.43	7.47	20.27
17.85	6.18	27.16	17.91	6.46	28.18	16.6	5.12	24.57	18.88	5.6	28.91
9.41	2.21	12.23	9.37	2.17	13.9	7.78	1.99	12	7.32	1.87	10.62

nov-13			dic-13			ene-14			feb-14		
Casa	deposito	Breteau									
14.11	3.04	22.29	10.2	3.01	17.4	9.51	2.64	14.31	8.55	2.41	14.09
1.2	0.24	1.2	0	0	0	0	0	0	0.45	0.11	0.45
16.15	6.23	29.18	12.79	4.03	16.9	10.98	3.79	12.89	9.19	3.78	11.44
19.03	8.45	22.29	15.4	7.09	18	15.26	7.04	17.54	17.94	8.74	21.06
18.4	5.85	27.92	14.9	4.58	17.47	14.89	5.41	19.06	13.85	4.53	16.27
8.76	1.88	10.77	5.65	1.34	6.87	5.82	1.51	7.76	12.27	3.31	17.07

mar-14			abr-14			may-14			jun-14		
Casa	Deposito	Breteau									
8.11	1.69	11.1	12.72	3.13	16.84	15.26	3.46	19.83	14.18	4.69	24.44
0.35	0.08	0.35	0.64	0.21	0.8	1.83	0.41	1.83	1.56	0.38	1.56
15.69	5.13	21.57	12.27	5.05	16.59	13.05	5.63	21.6	20.5	8.72	41.51
17.32	8.59	20.11	20	8.5	24.17	18.45	6.41	20	19.73	8.2	22.01
14.3	5.2	17.42	14.9	5.05	18.63	17.31	6.15	25.71	20.76	6.57	32.55
8.7	1.83	10.19	9.34	1.73	12.16	17.87	3.78	22.36	13.7	3.22	22.87

jul-14			ago-14			sep-14			oct-14		
Casa	Deposito	Breteau									
20.33	5.93	43.29	21.62	7.69	51.26	21.38	7.18	43.54	19.91	5.08	30.09
2.51	0.58	2.51	3.85	0.95	4.23	4.52	1.18	5.59	3.95	0.81	4.44
16.93	7.07	29.17	14.36	6.12	24.68	16.87	8.74	35.6	12.75	6.09	22.51
20.37	9.66	24.72	22.64	8.67	28.65	21.22	8.74	25.61	21	8.66	27.8
19.25	6.01	26.67	21.59	6.28	33.64	21.2	8.51	41.73	22.29	7.35	35.65
10.17	3.93	16.28	17.62	3.49	24.4	19.4	4.22	29	11.02	2.74	15.66

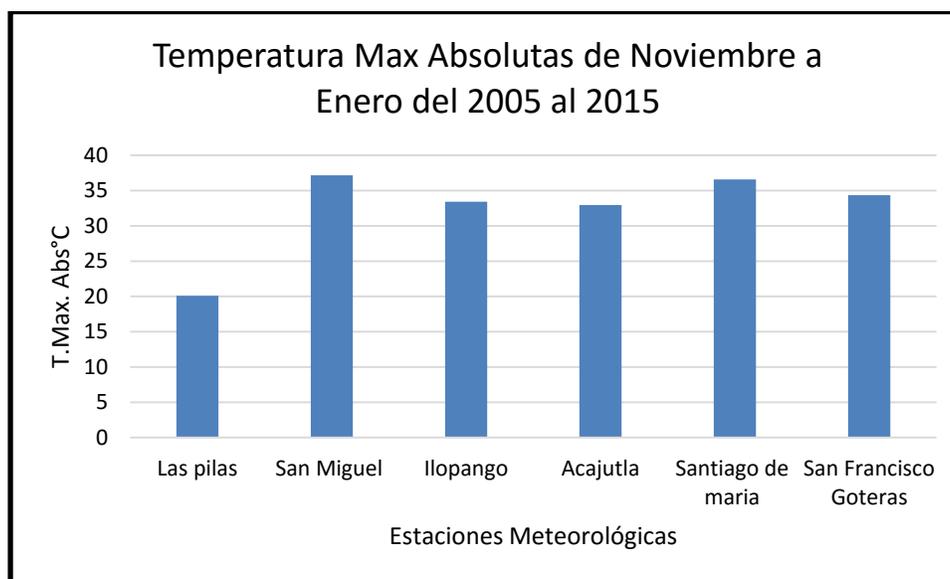
nov-14			dic-14			ene-15			feb-15		
Casa	Deposito	Breteau									
11.38	2.85	14.79	9.71	4.32	19.26	9.54	3.02	13.43	5.88	1.72	6.88
1.9	0.42	2.22	1	0.2	1	2.24	0.51	2.24	1.8	0.37	1.8
16.57	7.95	26.55	10.84	3.92	12.8	13.1	4.64	16.4	10.41	4.49	13.81
16.02	6.48	20.03	19.17	7.54	23.03	15.8	6.57	17.92	19.4	8.22	22.2
16.78	5.8	24.16	16.07	5.82	23.74	16.74	5.81	19.86	14.57	5.43	17.9
9.87	2.09	10.94	9.19	2.01	10.62	8.85	1.87	9.62	9.47	1.96	10.79

mar-15			abr-15			may-15			jun-15		
Casa	Deposito	Breteau									
10.38	3.16	12.16	9.82	2.53	14.41	9.99	3.69	16.72	13.73	8.15	33.35
4.92	1.19	4.92	2.37	0.62	2.37	1.95	0.34	1.95	2.76	0.64	2.76
10.41	4.49	13.81	11.95	5.77	19.89	15.11	6.13	21.23	18.76	9.54	34.74
20.03	5.64	22.89	16.82	6.35	19.37	17.32	6.97	21.84	22.97	7.61	27.54
14.57	5.43	17.9	15.43	4.76	17.59	18.38	5.64	22.3	19.67	6.86	28.21
9.47	1.96	10.79	10.88	2.96	13.99	14.68	3.34	18.18	15.92	3.86	22.39

jul-15			ago-15			sep-15			oct-15		
Casa	Deposito	Breteau									
12.18	4.26	22.68	12.15	3.12	17.94	11.91	4.22	21.17	18.49	6.7	31.89
3.78	0.82	4.03	4.12	0.93	4.12	2.23	0.46	2.23	2.97	0.62	2.97
14.4	5.37	20.3	10.61	3.84	14.96	14.4	5.87	20.68	15.26	5.88	21.34
23.23	8.65	29.55	24.48	7.85	33.26	22.78	8.42	33.7	23.9	9.25	35.34
13.82	4.34	17.6	14.78	4.7	17.73	16.2	4.87	23.05	14.22	5.03	18.48
13.36	3.64	18.09	18.04	4.29	23.27	15.21	4.13	22.47	16.13	4.04	22.18

nov-15			dic-15		
Casa	deposito	Breteau	Casa	deposito	Breteau
13.6	5.3	25.57	8.05	2.72	13.38
0.5	0.11	0.5	3.33	0.76	3.64
14.15	6.51	23.62	14.08	6.44	21.34
20.56	8.28	27.2	25.14	8.84	34.86
20.91	7.14	33.38	16.77	4.54	20.34
17.66	3.95	21.39	13.75	3.41	18.07

Anexo 6: Temperaturas máximas de las 6 estaciones meteorológicas de enero a noviembre del 2005 al 2015, referentes a los municipios evaluados (Fuente: centro de información Agroclimática, MINSAL).



Anexo 7: Temperaturas máximas de las 6 estaciones meteorológicas de febrero a octubre del 2005 al 2015, referentes a los municipios evaluados (Fuente: centro de información Agroclimática, MINSAL).

