

Las moscas negras (Diptera: Simuliidae) en cursos de agua urbanos y suburbanos de la ciudad de Vitoria-Gasteiz (País Vasco, España)

Mikel Alexander González¹ , Pedro María Alarcón-Elbal² , Carlos Barceló¹  e Ignacio Ruiz-Arondo^{3,*} 

¹ Zoología Aplicada y de la Conservación (ZAP), Universidad de las Islas Baleares (UIB), Crta de Valldemossa km 7.5, 07122, Palma de Mallorca, España.

² Departamento de Producción y Salud Animal, Salud Pública Veterinaria y Tecnología y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera CEU, 46115, Valencia, España.

³ Centro de Rickettsiosis y Enfermedades transmitidas por Artrópodos Vectores, Hospital Universitario San Pedro - CIBIR, C/Piqueras 98, 3ª planta, 26006, La Rioja, España.

* Corresponding author: iruizarr@gmail.com

Received: 09/03/22

Accepted: 06/05/22

RESUMEN

Las moscas negras (Diptera: Simuliidae) en cursos de agua urbanos y suburbanos de la ciudad de Vitoria-Gasteiz (País Vasco, España)

Los simúlidos o moscas negras son una familia de dípteros en creciente estudio en España, debido a su interés como bioindicadores de la calidad del medio acuático y a su impacto médico-veterinario. Su estudio es limitado en las comunidades autónomas que conforman la región cantábrica, y en especial en el País Vasco, donde apenas existen trabajos sobre su ecología y descripción de las especies presentes. Se muestrearon las fases inmaduras de los simúlidos durante la primavera de 2021 en ocho cursos de agua ubicados en el núcleo urbano y suburbano de la ciudad de Vitoria-Gasteiz (Álava). Un total de ocho especies de moscas negras fueron identificadas mediante morfología clásica y análisis molecular. A partir del estudio de larvas maduras (n = 379) y de adultos emergidos (n = 351) en el laboratorio, se estimó que el grupo *Simulium* (*Simulium*) *ornatum* (*S. intermedium*, *S. ornatum* s.l. y *S. trifasciatum*) fue el conjunto de especies mayoritario, seguido del subgénero *Wilhelmia* (*S. equinum* y *S. lineatum*), *S. (Boophthora) erythrocephalum*, *S. (Eusimulium) rubzovianum* y *Prosimulium* (*Prosimulium*) *tomosvaryi*. *Simulium ornatum* s.l. y *S. rubzovianum* se capturaron en la mayoría de los cursos de agua, mientras que el resto de especies tuvieron una distribución más restringida. La riqueza de especies en los cursos de agua varió entre una y siete especies. Los sustratos de fijación más recurrentes por las fases inmaduras fueron los helófitos *Typha* sp. y *Scirpus* sp. Los simúlidos fueron más abundantes durante el primer periodo de captura. Este trabajo aporta las primeras citas de la familia Simuliidae para el País Vasco, incorpora imágenes de interés de los principales caracteres diagnósticos de larvas, pupas y adultos de las especies más abundantes, y discute sucintamente los resultados obtenidos en relación a la problemática taxonómica existente en el grupo *S. ornatum*.

Palabras clave: diversidad, código de barras de ADN, simúlidos, *Simulium ornatum* s.l.

ABSTRACT

Blackflies (Diptera: Simuliidae) in urban and suburban water courses of the city of Vitoria-Gasteiz (Basque Country, Spain)

Simuliids or blackflies are a family of Diptera in increasing study in Spain due to their interest as bioindicators of the quality of the aquatic environment and their medical-veterinary impact. Their study is cursory in those Autonomous Regions that constitute the Cantabrian region, and especially in the Basque Country, where there are few studies on their ecology or species description. The immature stages of simuliids were sampled during the spring of 2021 in eight water courses located in the urban and suburban areas of the city of Vitoria-Gasteiz (Álava). A total of eight species of blackflies were identified by classical morphology and molecular analysis. From the study of mature larvae (n = 379) and emerged adults (n = 351) in the laboratory, it was estimated that the *Simulium* (*Simulium*) *ornatum* group (*S. intermedium*, *S. ornatum* s.l. and *S. trifasciatum*) accounted

for most of the collections, followed by the *Wilhelmia* subgenus (*S. equinum* and *S. lineatum*), *S. (Boophthora) erythrocephalum*, *S. (Eusimulium) rubzovianum* and *Prosimulium (Prosimulium) tomosvaryi*. *Simulium ornatum s.l.* and *S. rubzovianum* were captured in most of the water courses, while the remaining species had a more restricted distribution. The species richness in the water courses ranged from one to seven species. The most recurrent fixation substrates by the immature stages were helophytes such as *Typha sp.* and *Scirpus sp.* Simuliids were more abundant during the first capture period. This study provides the first records of the family Simuliidae for the Basque Country, incorporates color images of interest of the main diagnostic characters of larvae, pupae and adults of the most abundant species recorded, and briefly discusses the results obtained in relation to the unresolved taxonomic status of the group *S. ornatum*.

Key words: diversity, DNA barcoding, simuliids, *Simulium ornatum s.l.*

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) License.

INTRODUCCIÓN

Los simúlidos (Diptera: Simuliidae), comúnmente conocidos como moscas negras, son una familia de dípteros nematóceros de pequeño tamaño (de 2 a 5 mm), cuyos adultos presentan una coloración generalmente oscura con patrones de colores vistosos y aspecto giboso (Ruiz-Arrondo et al., 2014), características morfológicas que los ha llevado a ser reconocidos también como “*buffalo gnats*” en algunos países anglosajones.

Las formas inmaduras (larvas y pupas) viven y se desarrollan en ecosistemas acuáticos lóticos. Son organismos bentónicos de corrientes de agua oxigenadas que constituyen un importante recurso trófico para otros invertebrados y vertebrados que habitan estos ecosistemas (Wallace & Webster, 1996). En nuestro contexto geográfico, estos dípteros son, junto con los quironómidos (Diptera: Chironomidae), una de las familias más dominantes en los cursos fluviales (Puig et al., 1984; Arluziaga, 2002). Se comportan como taxones generalistas, si bien es un grupo de macroinvertebrados ampliamente utilizado como indicadores de la calidad del agua (Martínez-Ruiz & Portillo-Rubio, 1999). De hecho, la familia Simuliidae posee una puntuación de cinco sobre diez en el cálculo del índice B.M.W.P. (Biological Monitoring Working Party) (MAAMA, 2013). Por lo tanto, los simúlidos se encuentran a medio camino entre los organismos estenoicos, sensibles a la contaminación y los organismos eurioicos capaces de sobrevivir en medios muy perturbados.

Por otra parte, los adultos viven en el medio aéreo, siendo las hembras de muchas especies hematófagas de vertebrados. Este comportamiento

parasitario les confiere una gran relevancia sanitaria y veterinaria por las molestias que ocasionan sus picaduras, así como un notable interés epidemiológico al ser potenciales vectores de patógenos como virus, protozoos y nematodos (Adler & McCreadie, 2002). En latitudes tropicales, los simúlidos pueden actuar como vectores biológicos de nematodos filarioideos (Spirudida: Onchocercidae) causantes de oncocercosis y mansonellosis en humanos (Adler et al., 2004). En España, se ha registrado la circulación de filarias de importancia veterinaria, algunas de ellas con potencial zoonótico como *Onchocerca lupi* Rodonaja, 1967, transmitido por simúlidos a animales silvestres y domésticos (Miró et al., 2016) y también la especie *Onchocerca flexuosa* (Wedl, 1856) (Hidalgo et al., 2015). Asimismo, este grupo de insectos juega un papel importante en la transmisión de parásitos del género *Leucocytozoon* spp. y *Trypanosoma* spp. a nivel mundial (Votýpka et al., 2002; Adler et al., 2004; Reeves et al., 2007).

A pesar de su rol como vector, en España la mayor preocupación recae en las molestias que generan sus picaduras (Ruiz-Arrondo et al., 2017, 2020; Sánchez-López et al., 2018). Varios ríos de la Comunidad Valenciana y la Comunidad de Madrid, el Ebro y varios de sus afluentes a su paso por Cataluña y Aragón constituyen hoy en día las principales regiones españolas donde la plaga de simúlidos está generando graves perjuicios. Las principales especies cuyas poblaciones pueden ser consideradas plaga son *Simulium (Boophthora) erythrocephalum* (De Geer, 1776) y algunas de las especies integrantes del subgénero *Wilhelmia* (Ruiz-Arrondo et al., 2014, 2017). La aparición de poblaciones masivas de estas especies en

el río Ebro se ha ido sucediendo paulatinamente río arriba desde Cataluña hasta Aragón, afectando hoy en día, aunque en menor medida, al tramo que discurre por Logroño (observación personal de Ruiz-Arrondo). Aunque el País Vasco es una de las regiones donde no se tiene constancia de quejas ciudadanas por picaduras y/o molestias provocadas por simúlidos, el desarrollo masivo de estas especies plaga, por la alteración antrópica de los cursos de agua, podría afectar igualmente a esta región en el futuro (Ruiz-Arrondo et al., 2014).

La ausencia de estudios sobre esta familia a nivel taxonómico y ecológico en el territorio vasco, junto con las experiencias acaecidas en ríos de regiones urbanas próximas, motivó la realización de este estudio en varios cursos de agua de la ciudad de Vitoria-Gasteiz. El objetivo de este trabajo consistió en determinar la composición específica, abundancia relativa y hábitats larvares de las moscas negras en cursos de agua urbanos y suburbanos. Con el objetivo de facilitar la identificación morfológica de los simúlidos, se fotografiaron los principales caracteres diagnósticos de larvas, pupas y adultos (hembras y machos) de las especies más abundantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron un total de ocho cursos de agua, siendo estos los más representativos de la zona urbana y suburbana de Vitoria-Gasteiz, capital de la Comunidad Autónoma del País Vasco (Fig. 1). La mayoría de estos puntos de muestreo pertenecieron a pequeños cursos de agua (riachuelos y arroyos), a excepción de los puntos 2, 4 y 6, categorizados como ríos en función del volumen de agua y la anchura del cauce (Tabla 1). Los cursos de agua fueron muestreados en dos periodos de la primavera de 2021 (1^{er} periodo del 14 al 16 de mayo y 2^o periodo del 14 al 16 de junio) por el mismo investigador. Los puntos específicos de muestreo fueron seleccionados atendiendo a su accesibilidad, por lo que frecuentemente se ubicaron en las cercanías de puentes y/o pasos transitables.

Cada punto de muestreo fue recorrido a pie en un tramo de aproximadamente 100 m con un esfuerzo de muestreo de 30 minutos. Durante este tiempo, el investigador recogió a mano los sus-



Figure 1. Localización de los ocho puntos de muestreo en el núcleo urbano y suburbano de Vitoria-Gasteiz (Álava, País Vasco-PV, Norte de España). Mapa obtenido a partir de Google Maps (2021). *Location of the eight sampling points in the urban and suburban areas of Vitoria-Gasteiz (Álava, Basque Country-BC, Northern Spain). Map obtained from Google Maps (2021).*

tratos con larvas y pupas adheridas, tanto en las orillas, como en la parte central de cada tramo muestreado. Todo el material fue depositado sobre una bandeja blanca de plástico con agua. Las muestras se clasificaron en función del número de larvas y pupas (agrupadas conjuntamente) recogidas en tres categorías según su densidad: baja, en muestras con ≤ 100 individuos; moderada, entre 100-500 individuos; y, alta con ≥ 500 individuos. Los sustratos de adhesión de las larvas y las pupas fueron determinados para cada lugar de muestreo (Tabla 1). Posteriormente, las larvas se fijaron en etanol al 70 %. Los sustratos (orgánicos e inorgánicos) con pupas fueron ubicados en dispositivos de emergencia de adultos (Mosquito Breeder, BioQuip Products Inc., USA) cuando la densidad de pupas fue moderada y alta, y en placas de Petri (10 cm de diámetro) con fondo de papel de filtro humedecido cuando la densidad de pupas fue baja. Todos los eclosionadores se mantuvieron a la sombra, con una temperatura de 25 ± 3 °C y un fotoperiodo de 12/12 horas. Los adultos emergidos fueron aspirados diariamente hasta los cuatro días tras su recogida, sacrificados por congelación y conservados en seco a -15 °C.

Table 1. Características de los cursos de agua muestreados en el área urbana y suburbana de Vitoria-Gasteiz durante la primavera de 2021. ¹ Se establece el siguiente criterio para distinguir la diferente tipología de los cursos de agua: río (≥ 4 m de anchura), arroyo (1-4 m) y riachuelo (≤ 1 m). ² Se indican en orden de abundancia decreciente los principales sustratos de adhesión. ³ Densidad durante el primer (1^{er}) y segundo (2^o) periodo de muestreo calculada de acuerdo al siguiente criterio: baja: ≤ 100 individuos; moderada: 100-500 individuos; alta: ≥ 500 individuos. *Characteristics of the water courses sampled in the urban and suburban areas of Vitoria-Gasteiz during the spring of 2021.* ¹ The following criteria is established to distinguish the different typology of water courses: river (≥ 4 m width), stream (1-4 m) and creek (≤ 1 m). ² The main fixation substrates are indicated in order of decreasing abundance. ³ Density during the first (1st) and second (2nd) sampling period calculated according to the following criteria: low: ≤ 100 individuals; moderate: 100-500 individuals; high: ≥ 500 individuals.

Punto	Nombre	Categoría ¹	Sustrato de adhesión ²	Lecho	Densidad ³	
					1 ^{er}	2 ^o
1	Ihurre	Arroyo	<i>Ranunculus penicillatus</i> , <i>Iris pseudacorum</i> y <i>Ceratophyllum</i> sp.	Pedregoso	Baja	Baja
2	Zadorra	Río	<i>Scirpus lacustris</i> , <i>Typha</i> sp. y piedras	Pedregoso	Alta	Media
3	Batán	Arroyo	Hojas sueltas, raíces, plásticos, cantos rodados y cortezas	Pedregoso	Baja	Media
4	Errekaleor	Río	Piedras, <i>Fontinalis</i> sp., <i>Carex</i> sp., poáceas, restos vegetales y residuos sólidos urbanos	Pedregoso	Alta	Baja
5	Santo Tomás	Arroyo	<i>Typha</i> sp., <i>Fontinalis</i> sp., algas verdes filamentosas, <i>Equisetum</i> sp., residuos sólidos urbanos, <i>Carex</i> sp., y piedras	Pedregoso/arenoso	Media	Baja
6	Alegría	Río	<i>Scirpus lacustris</i> , <i>Typha</i> sp., <i>Carex</i> sp., <i>Juncus</i> sp., <i>Iris pseudacorus</i> , y otras plantas acuáticas	Pedregoso/fangoso	Alta	Media
7	Armentia	Riachuelo	<i>Apium nodiflorum</i> y <i>Veronica beccabunga</i>	Pedregoso/fangoso	Baja	Nula
8	Fuente de Torroguico	Riachuelo	Piedras y <i>Carex</i> sp.	Pedregoso/fangoso	Baja	Nula

De forma puntual, se individualizaron algunas pupas del conjunto de muestras en placas de Petri (3 cm de diámetro), con el fin de poder estudiar y relacionar morfológicamente el estuche y la exuvia pupal con su correspondiente imago emergido.

Para el cálculo de la abundancia relativa de cada especie, se contabilizaron las larvas maduras (larvas con los histoblastos desarrollados) y los adultos emergidos a partir de las pupas en el laboratorio. Las larvas maduras, pupas y adultos (hembras y machos) de cada especie fueron fotografiadas bajo una lupa binocular mediante el uso del dispositivo móvil Huawei P30 Pro a mano alzada.

Únicamente las larvas maduras (n = 379) y los adultos emergidos (n = 351) fueron utilizados para la determinación taxonómica, la cual se llevó a cabo mediante el empleo de claves dicotómicas y fotografías de la simuliidofauna ibérica, así como de otras regiones mediterrá-

neas (González, 1997; Belqat & Dakki, 2004; Lestón, 2012).

Las hembras y machos incluidos en el grupo *Simulium ornatum* (*Simulium* (*Simulium*) *intermedium* Roubaud, 1906, *Simulium* (*Simulium*) *ornatum* s.l. Meigen, 1818 y *Simulium* (*Simulium*) *trifasciatum* Curtis, 1839) fueron inicialmente agrupados en conjunto. Su abundancia relativa se estimó en base a la coloración de la frente (hembras, n = 98) y a la morfología de la lámina media en preparaciones microscópicas (machos, n = 20). También se realizaron preparaciones microscópicas de las genitales de 22 machos que conformaban el subgénero *Wilhelmia* además de las genitales de tres machos de las especies restantes. Se utilizó líquido de Hoyer como medio de montaje, previa inmersión de los ejemplares en una solución de KOH (20 %) durante 12 horas a temperatura ambiente, para facilitar su aclarado.

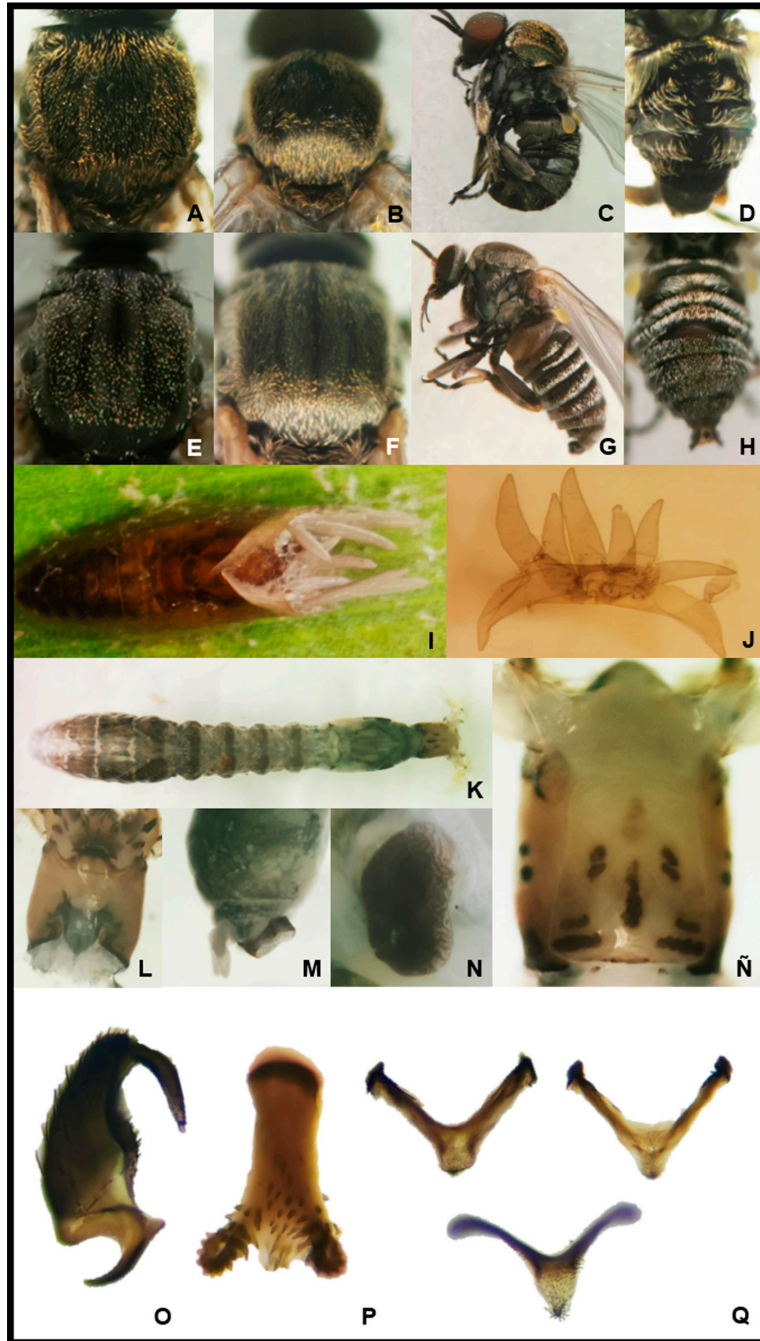


Figure 2. *Simulium equinum*. Macho imago: tórax (luz anterior y cenital) (A); tórax (luz posterior) (B); visión lateral (C); dorso del abdomen (D). Hembra imago: tórax (luz anterior y cenital) (E); tórax (luz posterior) (F); visión lateral (G); dorso del abdomen (H). Pupa: visión dorsal (I); filamentos respiratorios (J). Larva madura: aspecto general (K), vista ventral de la cápsula cefálica (L); vista lateral de la parte posterior del abdomen (M); histoblasto (N); manchas del frontoclipeo (Ñ). Genitalia del macho: estilo y coxito (O); furca (P); diferentes orientaciones de la lámina media (Q). *Simulium equinum*. Male imago: thorax (anterior and zenithal light) (A); thorax (posterior light) (B); lateral view (C); abdomen, dorsal view (D). Female imago: thorax (anterior and zenithal light) (E); thorax (posterior light) (F); lateral view (G); abdomen, dorsal view (H). Pupa: dorsal view (I); pupal gill filaments (J). Mature larva: general appearance (K), head capsule, ventral view (L); terminalia of abdomen, lateral view (M); gill histoblast (N); head capsule, dorsal view (Ñ). Male genitalia: stylus and coxite (O); median sclerite (P); different orientations of ventral plate (Q).

Se emplearon técnicas de biología molecular usando el gen mitocondrial citocromo *c* oxidasa subunidad I (COI) (también llamado código de barras de ADN, *DNA barcoding*) en 19 individuos adultos y tres larvas (con patrón de frontoclípeo

y/o dentición atípica) para confirmar la identificación morfológica, además de obtener nuevas secuencias españolas para estas especies. Se siguió el protocolo detallado en Ruiz-Arondo *et al.* (2018) para la extracción de ADN, realización

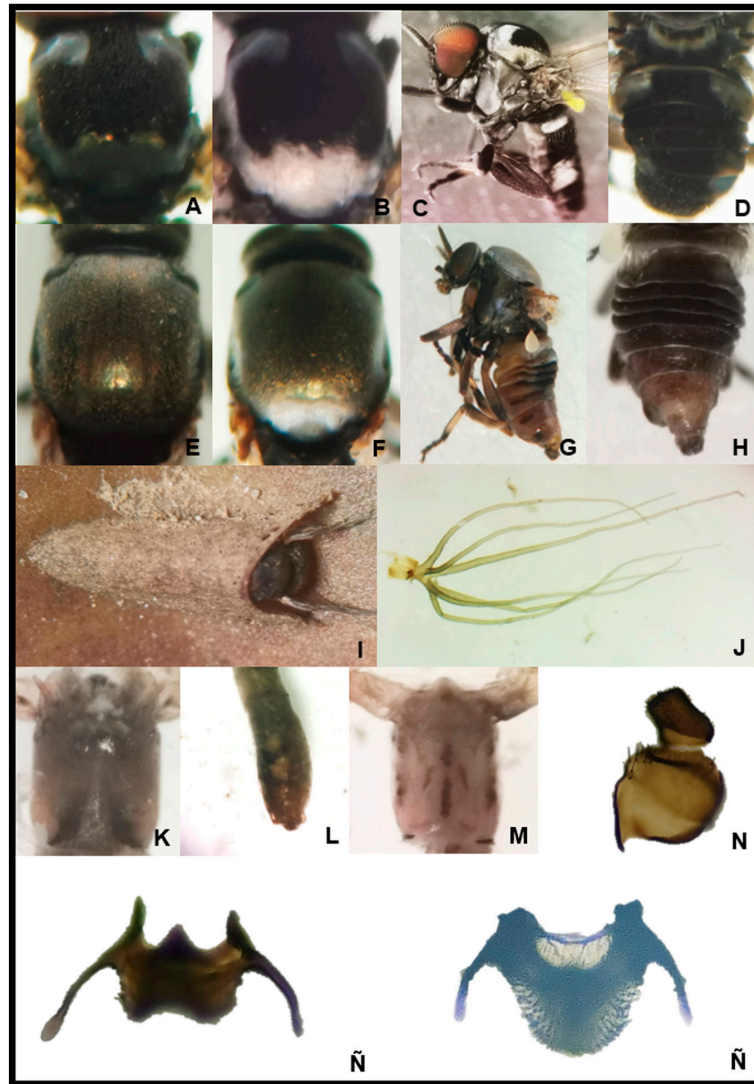


Figure 3. *Simulium erythrocephalum*. Macho imago: tórax (luz anterior y cenital) (A); tórax (luz posterior) (B); visión lateral del cuerpo (C); dorso del abdomen (D). Hembra imago: tórax (luz anterior y cenital) (E); tórax (luz posterior) (F); visión lateral del cuerpo (G); dorso del abdomen (H). Pupa: visión dorsal (I); filamentos respiratorios (J). Larva madura: vista ventral de la cápsula cefálica (K); manchas del frontoclípeo (M). Genitalia del macho: estilo y coxito (N); lámina media en diferentes orientaciones (Ñ). *Simulium erythrocephalum*. Male imago: thorax (anterior and zenithal light) (A); thorax (posterior light) (B); body, lateral view (C); abdomen, dorsal view (D). Female imago: thorax (anterior and zenithal light) (E); thorax (posterior light) (F); body, lateral view (G); abdomen, dorsal view (H). Pupa: dorsal view (I); pupal gill filaments (J). Mature larva: head capsule, ventral view (K); terminalia, posterior view (L); head capsule, dorsal view (M). Male terminalia: stylus and coxite (N); different orientations of ventral plate (Ñ).

de la PCR y secuenciación Sanger. Por último, se compararon las secuencias obtenidas con las secuencias depositadas en GenBank mediante el algoritmo BLAST. Con la excepción de un espécimen a priori identificado morfológicamente como *S. trifasciatum*, todas las secuencias del COI generadas en este estudio se depositaron en GenBank (números de acceso: OM936886-OM936904). Para comprobar las relaciones genéticas entre los individuos se realizó un árbol de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, ML) usando el modelo de Tamura 3-parameter (Kumar et al., 2018) en el programa Mega X, siguiendo lo descrito en González et al. (2022). Para la denominación de las especies de simúlidos, se usó la nomenclatura taxonómica de Adler (2022). La nomenclatura de *Simulium (Eusimulium) velutinum* (Santos Abreu, 1922) fue sustituida por *Simulium (Eusimulium) rubzovianum* (Sherban, 1961), de acuerdo a los últimos estudios cromosómicos que indican que esta última sería la especie que habita en la península ibérica (Adler et al., 2015).

RESULTADOS

Ocho especies de moscas negras fueron identificadas en los ocho cursos de agua inspeccionados: *S. intermedium*, *S. ornatum* s.l., *S. trifasciatum*, *Simulium (Wilhelmia) equinum* (Linnaeus, 1758), *Simulium (Wilhelmia) lineatum* (Meigen, 1804), *S. erythrocephalum*, *S. rubzovianum* y *Prosimulium (Prosimulium) tomosvaryi* (Enderlein, 1921). En las láminas ilustradas (Figs. 2-7), se muestran las características diagnósticas más relevantes para la identificación visual de las larvas, pupas y adultos (hembras y machos) de las especies de simúlidos capturadas.

La abundancia relativa de los adultos emergidos indicó que el grupo *S. ornatum* fue el más abundante (49.8 % del total de capturas), seguido de las especies integradas en el subgénero *Wilhelmia*, *S. equinum* (Fig. 2) y *S. lineatum* (27.1 %), (Fig. 7), *S. erythrocephalum* (14.8 %) (Fig. 3) y *S. rubzovianum* (8.3 %) (Fig. 4) (Tabla 2). Dentro del grupo *S. ornatum*, la especie más abundante fue *S. intermedium* (73.5 %) (Fig. 6), seguida de *S. ornatum* s.l. (20.5 %) (Fig. 5) y *S. trifasciatum* (6.0 %) (Fig. 7). En relación a los machos montados de este mismo grupo *S. ornatum*, el 70 % co-

rrespondió a *S. intermedium*, el 25 % a *S. ornatum* s.l., y el 5 % a *S. trifasciatum*. Atendiendo a la genitalia de los machos del subgénero *Wilhelmia*, se determinaron dos especies: el 54 % perteneció a *S. equinum* y el 46 % a *S. lineatum*.

La abundancia relativa basada en la identificación morfológica de las larvas maduras mostró unas proporciones ligeramente diferentes, siendo también el grupo *S. ornatum* el predominante (56.6 %), seguido de *S. equinum* y *S. lineatum* (16.6 %), *S. rubzovianum* (8.2 %), *Simulium* spp. (8.4 %), *S. erythrocephalum* (1.6 %) y *P. tomosvaryi* (0.8 %) (Fig. 7) (Tabla 3). Los individuos incluidos como *Simulium* spp. presentaron un patrón del frontoclípeo indefinido que impidió su asignación a una especie en concreto. Se observó la presencia de un alto número de ejemplares (0-30 % de los individuos, dependiendo del curso de agua) parasitados por hongos y nematodos mermítidos.

Los resultados de las secuencias obtenidas a partir del gen COI y su distribución en el árbol ML (no mostrado) corroboraron las identificaciones morfológicas de las ocho especies. Las secuencias de *S. ornatum* s.l. (n = 7) presentaron una identidad del 97.57-100 % con respecto a los aislados de España (MG894270, MG894245, MG894294, MG894335 y KP861043) y Reino Unido (KP861032). Los individuos de *S. intermedium*, (n = 4) presentaron una identidad del 99.7-100 % con respecto a los individuos españoles MG894325 y MG894206. El único individuo a priori identificado morfológicamente como *S. trifasciatum*, mostró un 99.53 % de identidad con el individuo *S. trifasciatum* (KP861019) de Reino Unido. Según el árbol filogenético ML (no mostrado), esta secuencia se alinea en un clado diferente de *S. intermedium* y *S. ornatum* s.l., sin embargo los autores no consideraron adecuado depositarla en GenBank. *Simulium equinum* (n=2) presentó un 99.28 % y 100 % de similaridad respecto a los individuos de España (KF990264 y MG894241, respectivamente). La otra especie del subgénero *Wilhelmia* identificada, *S. lineatum*, (n = 1) presentó un 99.54 % de identidad respecto al individuo de España (MG894191). Por su parte, *S. rubzovianum* (n = 1) mostró un 98.09 % de identidad respecto al espécimen español MG894336. *Simulium erythrocephalum*

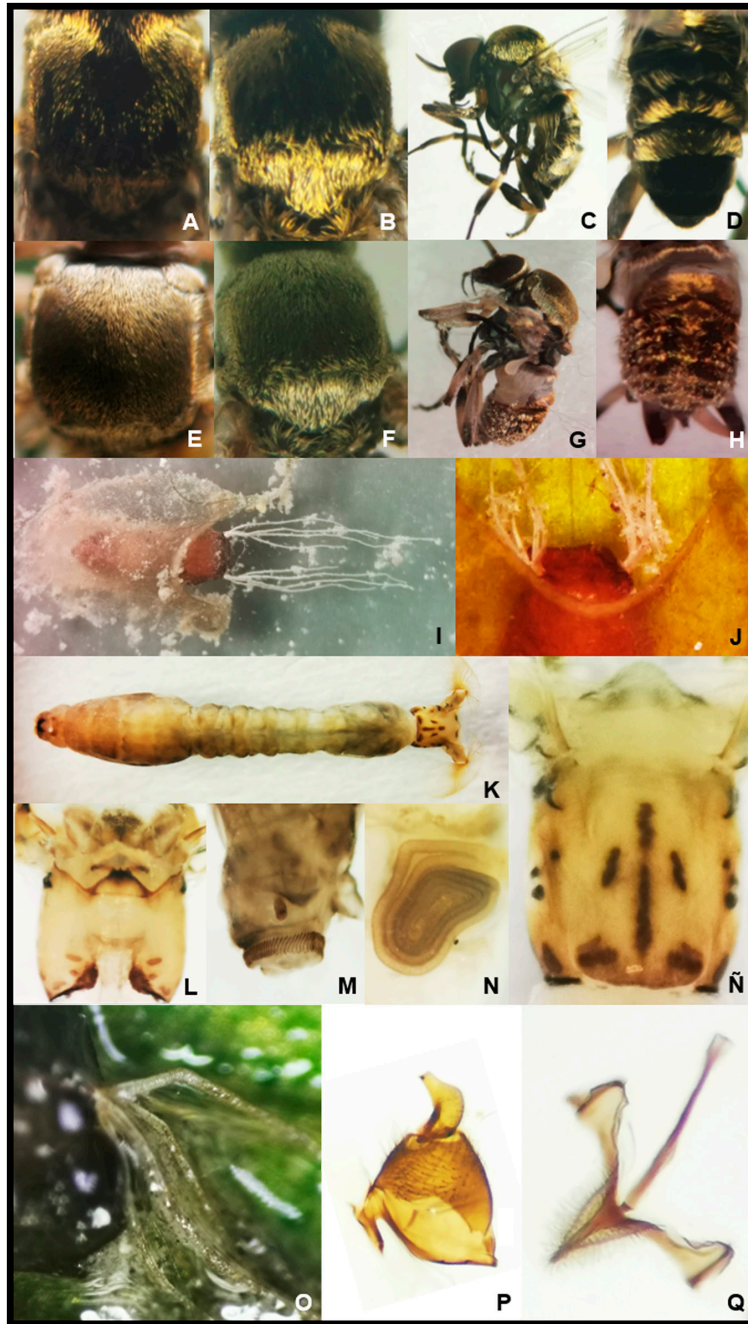


Figure 4. *Simulium rubzovianum*. Macho imago: tórax (luz anterior y cenital) (A); tórax (luz posterior) (B); visión lateral del cuerpo (C); dorso del abdomen (D). Hembra imago: tórax (luz anterior y cenital) (E); tórax (luz posterior) (F); visión lateral del cuerpo (G); dorso del abdomen (H). Pupa: visión dorsal (I); detalle del refuerzo anterior (J). Larva madura: aspecto general (K), vista ventral de la cápsula cefálica (L), vista lateral de la parte posterior del abdomen (M); histoblasto (N); manchas del frontoclípeo (Ñ). Pupa: base de los filamentos respiratorios (O). Genitalia del macho: estilo y coxito (P); Lámina media (Q). *Simulium rubzovianum*. *Male imago*: thorax (anterior and zenithal light) (A); thorax (posterior light) (B); body, lateral view (C); abdomen, dorsal view (D). *Female imago*: thorax (anterior and zenithal light) (E); thorax (posterior light) (F); body, lateral view (G); abdomen, dorsal view (H). *Pupa*: dorsal view (I); detail of anterior reinforcement (J). *Mature larva*: general appearance (K), head capsule, ventral view (L), terminalia, lateral view (M); gill histoblast (N); head capsule, dorsal view (Ñ). *Pupa*: base of gill filaments (O). *Male*: stylus and coxite (P); ventral plate (Q).



Figure 5. *Simulium ornatum* s.l. Macho imago: tórax (luz anterior y cenital) (A); tórax (luz posterior) (B). Hembra imago: tórax (luz anterior y cenital) (C); tórax (luz posterior) (D); visión lateral del cuerpo (E); Dorso del abdomen (F). Larva madura: aspecto general (G); vista ventral de la cápsula cefálica (H); vista lateral de la parte posterior del abdomen (I); histoblasto (J); manchas del frontoclípeo (K). Hembra imago: frente en diferentes orientaciones (L, M). Genitalia del macho: dos morfotipos de lámina media en visión lateral y anteroventral (N). *Simulium ornatum* s.l. Male imago: thorax (anterior and zenithal light) (A); thorax (posterior light) (B). Female imago: thorax (anterior and zenithal light) (C); thorax (posterior light) (D); body, lateral view (E); abdomen, dorsal view (F). Mature larva: general appearance (G); head capsule, ventral view (H); terminalia of abdomen, lateral view (I); gill histoblast (J); head capsule, dorsal view (K). Female imago: frons in different orientations (L, M). Male genitalia: two morphotypes of the ventral plate in lateral and anteroventral view (N).

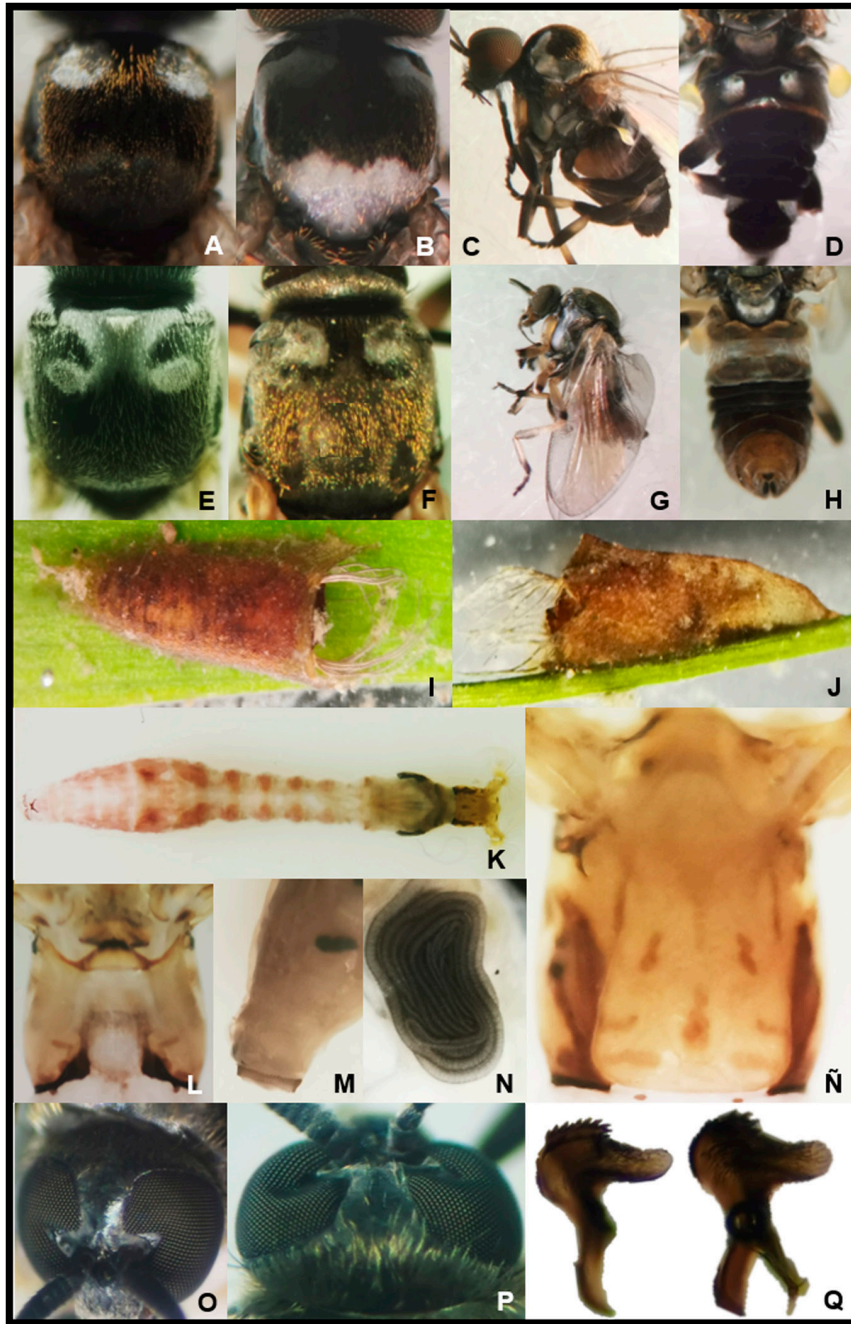


Figure 6. *Simulium intermedium*. Macho imago: tórax (luz anterior y cenital) (A); tórax (luz posterior) (B); visión lateral del cuerpo (C); dorso del abdomen (D). Hembra imago: tórax (luz anterior y cenital) (E); tórax (luz posterior) (F); visión lateral del cuerpo (G); dorso del abdomen (H). Pupa: visión dorsal (I); visión lateral (J). Larva madura: aspecto general (K); vista ventral de la cápsula cefálica (L); vista lateral de la parte posterior del abdomen (M); histoblasto (N); manchas del frontoclipeo (Ñ). Hembra imago: frente en diferentes orientaciones (O, P). Genitalia del macho: dos morfotipos de la lámina media en visión lateral (Q). *Simulium intermedium*. *Male imago*: thorax (anterior and zenith light) (A); thorax (posterior light) (B); lateral view of body (C); abdomen, dorsal view (D). *Female imago*: thorax (anterior and zenithal light) (E); thorax (posterior light) (F); body, lateral view (G); abdomen, dorsal view (H). *Pupa*: dorsal view (I); lateral view (J). *Mature larva*: general appearance (K); head capsule, ventral view (L); terminalia, lateral view (M); gill histoblast (N); head capsule, dorsal view (Ñ). *Female imago*: frons in different orientations (O, P). *Male genitalia*: two morphotypes of ventral plate in lateral view (Q).

(n = 1) presentó un 99.7 % de similitud respecto al aislado de España (MG894329). Finalmente, *P. tomosvaryi* (n = 2) mostró un 98.0 % y 99.4 % de identidad con los individuos de España

(MG894235 y MG894274, respectivamente).

En relación a su distribución, *S. ornatum* s.l. y *S. rubzovianum* aparecieron en siete cursos de agua, mientras que el resto de taxones mostraron

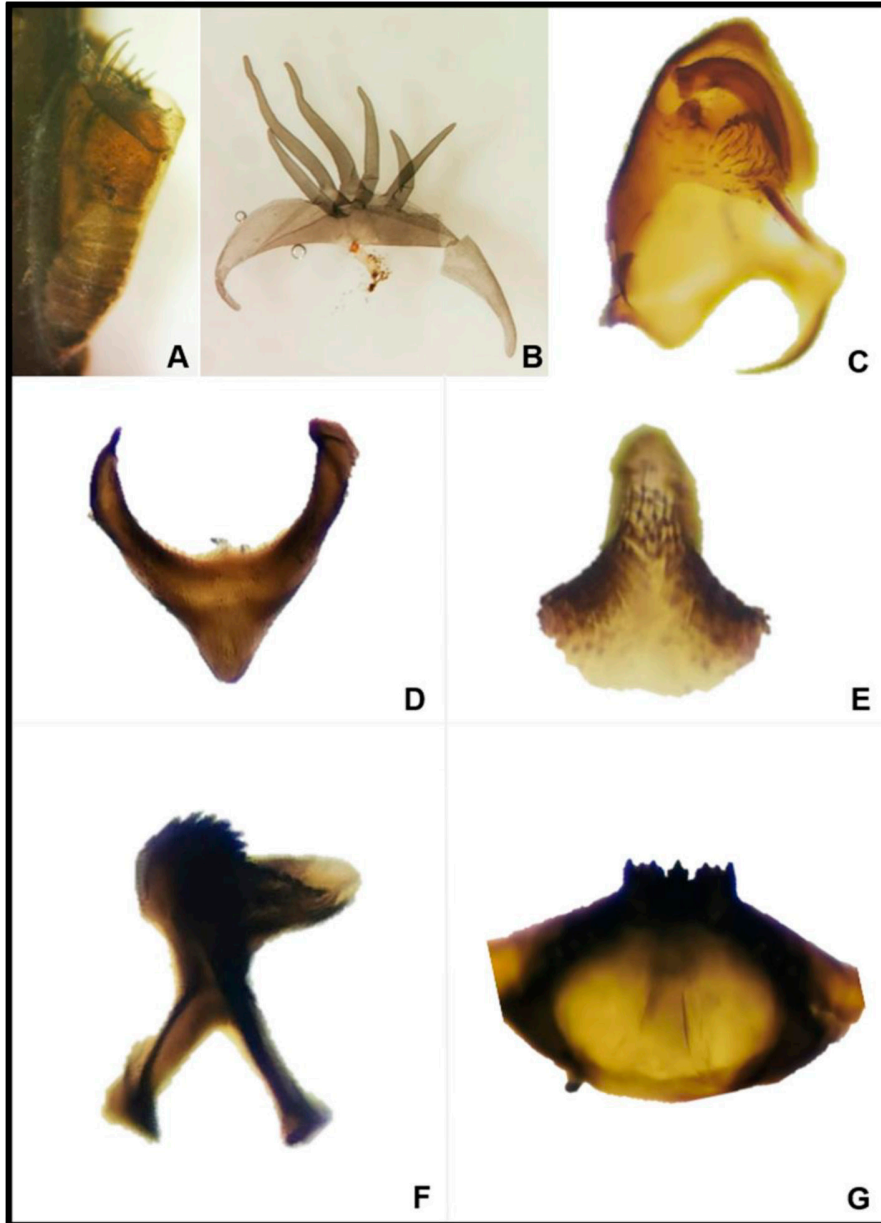


Figure 7. *Simulium lineatum*. Pupa: visión lateral (A); filamentos respiratorios (B). Genitalia del macho: estilo y coxite (C); lámina media (D); furca (E). *Simulium trifasciatum*, genitalia del macho: lámina media (F). *Prosimulium tomosvaryi*. Larva madura: dentición del submentón (G). *Simulium lineatum*, Pupa: lateral view (A); pupal gill filaments (B). Genitalia of male: stylus and coxite (C); ventral plate (D); median sclerite (E). *Simulium trifasciatum*. Genitalia of male: ventral plate (F). *Prosimulium tomosvaryi*. Mature larva: hypostoma (G).

una distribución más restringida (Tablas 2 y 3). Los cursos de agua categorizados como ríos tuvieron la mayor abundancia, con un 92 % de los adultos emergidos y un 54 % del total de las larvas maduras (Tablas 2 y 3). La riqueza específica de los simúlidos varió entre una especie (punto 3), dos especies (puntos 5, 6 y 7), tres especies (punto 1), cuatro especies (punto 4), seis especies (punto 2) y siete especies (punto 6). De acuerdo con las categorías de densidad poblacional, se observó que el segundo periodo de muestreo (14-16 de junio) resultó menos productivo en número de individuos que el primero (14-16 de mayo) (Tabla 1). Los sustratos de fijación fueron muy variables, incluyendo tanto orgánicos (plantas acuáticas, hojas, cortezas de árboles, algas, musgos, raíces, etc.), como inorgánicos (piedras, plásticos, escombros, botellas de vidrio, etc.). Los sustratos de fijación con el mayor número de individuos adheridos correspondieron a las plantas helófitas *Typha* sp. y *Scirpus* sp. (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Mientras que en España hay citadas 53 especies de simúlidos (Adler, 2022), en el País Vasco solo se han publicado algunos trabajos regionales sobre su presencia en varios tramos de ríos vascos (Riaño *et al.*, 1993; Arluziaga, 2002), pero no se ha profundizado en su determinación específica. Acorde a la revisión de López-Peña & Jiménez-Peydró (2017), no hay citada ninguna especie de simúlido para el País Vasco. Por lo tanto, el presente trabajo supone el primer acercamiento al estudio de la simulidofauna para esta región, incorporando un total de ocho nuevas citas de moscas negras. Este número previsiblemente aumentará en el futuro al profundizar en el estudio de estos dípteros en otros cursos fluviales naturales y/o rurales del territorio. En términos generales, las especies capturadas son relativamente frecuentes en gran parte del territorio peninsular, a excepción de *P. tomosvaryi*,

Table 2. Adultos de simúlidos emergidos a partir de pupas recogidas durante los dos periodos de muestreo en los ocho cursos de agua urbanos y suburbanos de Vitoria-Gasteiz. ¹ El grupo *S. ornatum* incluye las especies: *S. intermedium*, *S. ornatum* s.l., y *S. trifasciatum*. H = hembras, M = machos, T = total. El subgénero *Wilhelmia* incluye las especies *S. equinum* y *S. lineatum*. *Adult simuliids emerged from pupae collected during the two sampling periods in the eight urban and suburban water courses of Vitoria-Gasteiz. ¹ The group *S. ornatum* includes the species *S. intermedium*, *S. ornatum* s.l., and *S. trifasciatum*. H = females, M = males, T = total. The subgenus *Wilhelmia* includes the species *S. equinum* and *S. lineatum*.*

Punto	Subgénero <i>Wilhelmia</i>		Grupo <i>S. ornatum</i> ¹		<i>S. erythrocephalum</i>		<i>S. rubzovianum</i>		Total			%
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	T	
1	0	0	5	4	0	0	2	0	7	4	11	2.5
2	10	11	65	51	21	19	6	5	102	86	188	50.0
3	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0	3	1.1
4	0	0	3	2	0	0	2	0	5	2	7	1.8
5	0	0	5	1	0	0	2	0	7	1	8	2.5
6	62	12	17	19	5	7	9	3	93	41	134	41.9
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	72	22	98	77	26	26	26	21	8	217	134	
	94		175		52		29		351			

cuyo hallazgo es inusual, ya que su distribución es más limitada y asociada a ríos y arroyos de zonas montañosas o premontañosas (González, 1990; Ruiz-Arondo et al., 2018). Todas las especies capturadas están presentes en provincias limítrofes como La Rioja y Burgos (Martínez Ruiz & Portillo Rubio, 1999; López-Peña & Jiménez-Peydró, 2017), mientras que Navarra carece de citas, ya que no hay constancia hasta la fecha de ningún estudio sobre esta familia.

La riqueza de simúlidos obtenida en este estudio es similar a la informada por otros autores en el norte del país (Villanúa-Inglada et al., 2013), aunque inferior a la de otros trabajos acometidos en cuencas hidrográficas de la vertiente mediterránea (López Peña, 2018a). Ciertamente, esta cantidad varía en relación al número de muestreos, metodología empleada, estadio de identificación y época del año, además de la localización del área geográfica. Es importante resaltar que la mayoría de los cursos de agua muestreados correspondieron a pequeños riachuelos urbanos y no a ríos con mayor caudal, como los señalados por los anteriores autores. Los integrantes del grupo *S. ornatum* generalmente son encontrados en gran número, mostrando una amplia distribución y estando presentes durante la mayor parte del periodo primaveral-estival en comunidades limítrofes al País Vasco (Martínez-Ruiz & Portillo-Rubio, 1999). Este es uno de los taxones más frecuentes y ampliamente distribuidos en Europa (Jedlička,

1978), cuyas poblaciones se pueden encontrar en medios con condiciones muy dispares, en especial atendiendo al grado de mineralización y eutrofia, viéndose en ocasiones asociado negativamente a la concentración de materia orgánica en suspensión y a la oxidación permangánica (Bernotiene, 2006, 2015). Otros autores, sin embargo, destacan que *S. ornatum* s.l. tolera los aportes contaminantes procedentes de núcleos urbanos (Lestón et al., 2014), lo que está en consonancia con nuestro estudio, al ser el taxón más abundantemente encontrado en cursos de agua urbanos.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los dos periodos, y a falta de estudios más prolongados y sostenidos en el tiempo, se observa que, de forma general, las formas acuáticas de los simúlidos son más abundantes al final de la primavera que al principio del verano. En muchos ríos y cursos de agua del norte de España, los caudales máximos se dan en primavera, en parte por el deshielo de las montañas y por las precipitaciones primaverales, mientras que este caudal normalmente disminuye en verano debido a la reducción de las precipitaciones (Martínez Ruiz & Portillo Rubio, 1999). La perturbación del caudal tiene efectos negativos en la densidad de los depredadores de larvas de simúlidos, hecho que puede aumentar la abundancia y riqueza de especies en zonas de caudal bajo (Zhang et al., 1998). Otros autores han demostrado que estos nematóceros prefieren caudales elevados en zonas continentales.

Table 3. Larvas maduras de simúlidos recogidas durante los dos periodos de muestreo en los ocho cursos de agua urbanos y suburbanos de Vitoria-Gasteiz. ¹ El grupo *S. ornatum* incluye las especies: *S. intermedium*, *S. ornatum* s.l. y *S. trifasciatum*. El subgénero *Wilhelmia* incluye las especies *S. equinum* y *S. lineatum*. *Mature larvae of simuliids collected during the two sampling periods in the eight urban and suburban watercourses of Vitoria-Gasteiz.* ¹ *The group S. ornatum includes the species S. intermedium, S. ornatum s.l. and S. trifasciatum. The subgenus Wilhelmia includes the species S. equinum and S. lineatum.*

Punto	Subgénero <i>Wilhelmia</i>	Grupo <i>S. ornatum</i> ¹	<i>S. erythrocephalum</i>	<i>S. rubzovianum</i>	<i>P. tomosvaryi</i>	<i>Simulium</i> spp.	Total	%
1	1	22	0	11	0	0	34	8.9
2	2	52	3	1	0	0	58	15.3
3	0	12	0	0	0	8	20	5.3
4	0	50	0	0	3	3	56	14.8
5	5	30	0	0	0	2	37	9.7
6	85	37	3	4	0	18	147	38.8
7	0	3	0	1	0	0	4	1.0
8	0	8	0	14	0	1	23	6.1
Total	93	214	6	31	3	32	379	

les de Europa (Miliša *et al.*, 2022). De hecho, en tres de los lugares muestreados no se encontraron individuos durante el segundo periodo, situación que bien podría explicarse por la disminución del caudal (casi inexistente durante el segundo muestreo) y de la velocidad de los diferentes cuerpos de agua. En los dos ríos más caudalosos (Zadorra y Alegría), la pérdida de caudal no fue tan acusada, aunque sí se observó una disminución en la composición de la vegetación hidrófita y riparia, que explica la reducción de las formas preimaginales de los simúlidos en estos cauces. Otra de las razones de los cambios, tanto en la composición específica como en la abundancia, es la fenología de cada una de las especies. Por ejemplo, las poblaciones de *S. erythrocephalum* disminuyen de forma natural durante la segunda mitad del verano, tanto en la ciudad de Zaragoza (Ruiz-Arrondo *et al.*, 2017) como en otras regiones europeas (Ignjatović-Ćupina *et al.*, 2006). En consecuencia, se le debería dar más importancia a los estudios fenológicos de las especies de simúlidos del país cuyas poblaciones pueden ser consideradas plaga, cuando sobrepasan cierto umbral y ocasionan daños.

Desde 1995 hasta la actualidad, los simúlidos como plaga han venido adquiriendo una gran relevancia en ciertas regiones del territorio español. En concreto, las comunidades más afectadas han sido Aragón, Cataluña, Madrid y la Comunidad Valenciana (Gallego *et al.*, 1994; Villanúa-Inglada *et al.*, 2013; Ruiz Arrondo *et al.*, 2014, 2020; López-Peña, 2018b; Soriano Hernando *et al.*, 2019), pero recientemente se han sumado otras regiones como Murcia (Sánchez López *et al.*, 2018) y Andalucía (Obregón Romero *et al.*, 2016; Ricoy-Llavero *et al.*, 2020). En nuestro estudio, las especies del grupo *S. ornatum* y del subgénero *Wilhelmia* fueron las más abundantes, hecho que podría estar relacionado con la elevada tolerancia a la polución de ambos grupos, pudiendo sustituir a otras especies cuando hay un incremento de materia orgánica en el agua (Ciadamidaro *et al.*, 2016). De las ocho especies identificadas, *S. erythrocephalum* y *S. ornatum* s.l., junto con *S. sergenti* y otras especies del subgénero *Wilhelmia*, están consideradas como las más problemáticas en el país (Gallego *et al.*, 1994; Figueras *et al.*, 2011; Ruiz-Arrondo *et al.*, 2017; Sánchez-López

et al., 2018). De las anteriormente mencionadas, *S. erythrocephalum* y *S. ornatum* s.l. están presentes en los cursos de agua alaveses, aunque no parecen haber devenido en plaga hasta el momento, a tenor de las bajas densidades encontradas y la ausencia de incidencias por molestias por este grupo de insectos en el País Vasco. Asimismo, los propios investigadores no registraron picaduras de simúlidos durante las jornadas de muestreo. Sin embargo, un escenario muy diferente se ha observado recientemente a unos 100 km de Vitoria-Gasteiz, en La Rioja, en concreto en algunos tramos del río Ebro, así como en sus afluentes Iregua y Najerilla, donde se identificaron poblaciones importantes de *S. erythrocephalum* y especies del subgénero *Wilhelmia* causando molestias en personas y animales (observación personal de Ruiz-Arrondo).

Se ha especulado mucho sobre los posibles motivos que intervienen en la proliferación masiva de algunas especies con carácter dañino en ciertos cursos fluviales. Podrían relacionarse con múltiples factores, los más destacados son la modificación de las condiciones ambientales y el desequilibrio ecológico de los tramos fluviales, muchas veces relacionado por la acción antrópica que conllevan con frecuencia el desarrollo desproporcionado de plantas acuáticas en los cauces (Ruiz-Arrondo *et al.*, 2014). De hecho, se ha demostrado que este grupo de insectos es el primero en colonizar los cursos de ríos temporales y que existen incluso especies resistentes a la desecación (Bass, 1998; Miliša *et al.*, 2022). Además, se ha observado que la proliferación de macrófitos (particularmente hidrófitos) en los ríos ha propiciado la consiguiente colonización de los mismos por parte de los estados preimaginales de los simúlidos (Ruiz-Arrondo *et al.*, 2014; Soriano Hernando *et al.*, 2019). Esta relación entre macrófitos y simúlidos se hace más patente al observarse que las poblaciones preimaginales de *S. erythrocephalum* se mantuvieron en niveles por debajo del umbral de tolerancia al reducirse significativamente los hidrófitos del curso de agua (Soriano Hernando *et al.*, 2019). Es interesante resaltar que, según nuestro estudio, los ríos alaveses no presentan gran cantidad de plantas hidrófitas, con la excepción de *Ranunculus* sp. y *Ceratophyllum* sp. (punto 1), siendo más evidente la presencia

de helófitos como *Typha* sp., *Iris* sp., *Juncus* sp., *Scirpus* sp. y *Carex* sp., entre otros. Respecto a la selección de sustratos, no existe una opinión unánime sobre esta cuestión. No obstante, existen trabajos que demuestran que las pupas de algunas especies muestran preferencia por el tipo de sustrato sobre el que adherirse (Ofenböck et al., 2002; Kazanci, 2006; López-Peña et al., 2020). Tanto especies de *Juncus* como de *Typha* han sido citadas como sustratos de adhesión frecuentemente empleados por las fases inmaduras del grupo *S. ornatum* y *S. equinum* (López Peña, 2018a). En cualquier caso, se ha demostrado que los simúlidos poseen una gran plasticidad ecológica siendo capaces de adherirse tanto a sustratos rocosos, vegetales e inorgánicos, tal y como se ha observado en el presente trabajo.

La identificación precisa de las especies cuyas poblaciones pueden ser consideradas plaga es fundamental para realizar un control integrado exitoso. Sin embargo, los simúlidos son uno de los dípteros de importancia sanitaria cuya identificación taxonómica entraña mayor dificultad (Adler et al., 2015). Los motivos son variados, destacándose la gran variación intraespecífica (particularmente en las larvas), uniformidad morfológica de los adultos y la necesidad de montaje de su genitalia, así como la ausencia de claves actualizadas; de hecho, las que existen solo contemplan la simúlido-fauna de regiones concretas. En nuestro estudio, esta complejidad se ha hecho más patente en el caso concreto de las larvas, donde no fue posible llegar a una identificación fehaciente por morfología clásica en el 8.4 % de las formas maduras. Además, cabe destacar que la taxonomía de los principales grupos es particularmente dificultosa, ya que se han descrito numerosos complejos de especies. El código de barras de ADN es una herramienta que ayuda en la identificación precisa y rápida de especies, incluidas algunas que son morfológicamente crípticas (Hernández-Triana et al., 2012; Ruiz-Arrondo et al., 2018). En nuestro estudio, el *barcoding* ha demostrado ser de gran utilidad para confirmar la presencia de todas las especies, incluidas las especies del grupo *S. ornatum* y en la detección de individuos que hayan podido pasar desapercibidos a ojos de un inexperto (ej. *P. tomosvaryi*). Sin embargo, esta herramienta requiere de una identificación morfológica (o cro-

mosómica) previa de los ejemplares, que en algunas ocasiones puede ser incorrecta, empañando las bases de datos (Onder et al., 2019). Acorde a la discrepancia morfológica (curvatura de la cresta superior) de las láminas medias montadas de *S. ornatum* s.l., se podría sugerir la presencia en nuestro estudio de al menos dos morfotipos o morfotomas, a tenor del número descrito hasta ahora (Adler, 2022), aunque en nuestro caso el análisis de las secuencias del gen COI no plasmó estas diferencias morfológicas observadas. El grupo *S. ornatum* es uno de los más ampliamente distribuidos en la región paleártica y posee una gran diversidad críptica según varios estudios (Ruiz-Arrondo et al., 2018; Onder et al., 2019; Adler et al., 2021). Por ello, es necesario un enfoque cromosómico, morfológico y molecular integrado, en particular mediante el uso de múltiples genes, para proporcionar una mayor resolución dentro de este grupo de especies (Onder et al., 2019), aunque no siempre un enfoque integrado es garantía de obtener una clara resolución taxonómica para este grupo (Adler et al., 2021). Nuestro trabajo incluye por primera vez para España fotografías a color de los caracteres diagnósticos más importantes de varios simúlidos de relevancia, lo cual constituye un recurso de apoyo visual de las especies registradas. Los colores son especialmente importantes en la determinación taxonómica de los simúlidos adultos, ya que reflejan diferentes tonalidades en función de cómo la luz incide sobre ellos, dificultando aún más su identificación. Un ejemplo lo constituye la frente de algunas hembras del grupo *S. ornatum*, que pueden diferenciarse por el color. Los autores animan a los especialistas de esta familia a continuar perseverando en el estudio de estos insectos en el país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Agustí Agut i Escrig y Santos Cirujano Bracamonte por la ayuda en la determinación de algunas plantas y algas en este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

Adler, P. H., & McCreddie, J. W. (2002). Black flies (Simuliidae). Chapter 11. In: G. R. Mullen & L. A. Durden (eds.). *Medical and Vete-*

- primary Entomology (pp. 185-202), 1st Edition. Academic Press, San Diego, USA.
- Adler, P. H., Currie, D. C., & Wood, D. M. (2004). *The Black Flies (Simuliidae) of North America*. Cornell University Press. NY. USA.
- Adler, P. H., Cherairia, M., Arigue, S. F., Samraoui, B., & Belqat, B. (2015). Cryptic biodiversity in the cytogenome of bird-biting blackflies in North Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(3), 276-289. DOI: 10.1111/mve.12115
- Adler, P. H. (2022). *World blackflies (Diptera: Simuliidae): a comprehensive revision of the taxonomic and geographical inventory*. Acceso: <https://biomia.sites.clemson.edu/pdfs/blackflyinventory.pdf>
- Adler, P. H., Werner, D. & Kampen, H. (2021). Chromosomal and Molecular Diversity in the *Simulium ornatum* Group (Diptera: Simuliidae) in the Western Tian Shan Range of Central Asia. *Insects*, 12, 817. DOI: 10.3390/insects12090817.
- Arluziaga, I. (2002). Variación de la calidad de las aguas de los ríos guipuzcoanos al cabo de veinte años (1981-2001). *Munibe*, 53, 39-56.
- Bass, J. (1998). *Last-instar larvae and pupae of the Simuliidae of Britain and Ireland: a key with brief ecological notes*. Scientific Publications of the Freshwater Biological Association n. 55. Windermere. UK.
- Belqat, B., & Dakki, M. (2004). Clés analytiques des simules (Diptera) du Maroc. *Zoologica Baetica*, 15, 77-138.
- Bernotiene, R. (2006). On the distribution of blackfly larvae (Diptera, Simuliidae) in different rivers in Lithuania. *Studia Dipterologica*, 14, 19-25
- Bernotiene, R. (2015). The relationship between Blackflies (Diptera: Simuliidae) and some hydrochemical and hydrophysical parameters in large and medium-sized Lithuanian rivers. *River Research and Applications*, 31(6), 728-735. DOI: 10.1002/rra.2715.
- Ciadamidaro, S., Mancini, L., & Rivosecchi, L. (2016). Black flies (Diptera, Simuliidae) as ecological indicators of stream ecosystem health in an urbanizing area (Rome, Italy). *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 52(2), 269-276. DOI: 10.4415/ANN_16_02_20
- Figueras, L., Lucientes, J., Ruiz, I., Ramos, J. J., & Ferrer, L. J. (2011). Caso clínico. Ataque de simúlidos en rumiantes. *Albétar*, 147, 22-23.
- Gallego, J., Beaucournu-Saguez, F., & Portus, M. (1994). Aggressiveness of *Simulium* of the *ornatum* complex (Diptera Simuliidae) in Catalonia (Spain), First observation. *Parasite*, 1, 288.
- González, G. (1990). Sistemática y ecología de los Simuliidae (Diptera) de los ríos de Catalunya y de otras cuencas hidrográficas españolas. (PhD. Tesis. Universidad de Barcelona, España).
- González, G. (1997). *Claves para la identificación de las larvas y pupas de los simúlidos (Diptera) de la Península Ibérica*. Asociación Española de Limnología. Barcelona. Spain.
- González, M. A., Ruiz-Arrodo, I., Rodríguez-Sosa, M. A., Rueda, J., Oteo, J. A., & Alarcón-Elbal, P. M. (2022). New insights on black flies (Diptera: Simuliidae) from a touristic destination of Hispaniola. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42: 2281-2295. DOI: 10.1007/s42690-022-00760-3
- Hernández-Triana, L. M., Crainey, J. L., Hall, A., Fatih, F., MacKenzie-Dodds, J., Shelley, A. J., Zou, X., Post, R. J., Gregory, T. R., & Hebert, P. D. N. (2012). DNA barcodes reveal cryptic genetic diversity within the blackfly subgenus *Trichodagmia* Enderlein (Diptera: Simuliidae: *Simulium*) and related taxa in the New World. *Zootaxa*, 3514, 43-69.
- Hidalgo, M. R., Martínez, A., Carreño, R. A., González, S., Ferreras, M. C., & Díez, N. (2015). Levels of infection, pathology and nodule size of *Onchocerca flexuosa* (Nematoda: Onchocercidae) in red deer (*Cervus elaphus*) from northern Spain. *Journal of helminthology*, 89(3), 326-334. DOI: 10.1017/S0022149X1400011X
- Ignjatović-Ćupina, A., Zgomba, M., Vujanović, L. J., Konjević, A., Marinković, D., & Petrić, D. (2006). An outbreak of *Simulium erythrocephalum* (De Geer, 1776) in the region of Novi Sad (Serbia) in 2006. *Acta Entomologica Serbica*, 11, 97-114.
- Jedlička, L. (1978). Variability of some characters in *Odagmia ornata* (Meigen, 1818) and *Odagmia spinosa* (Doby et Deblock, 1957) (Diptera, Simuliidae). *Acta fakultatis rerum*

- naturalium universitatis comenianae zoología*, 23, 23-75.
- Kazanci, N. (2006). Ordination of Simuliidae and climate change impact. *Acta Entomológica Serbica*, Supplement: 69-76.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular and Biology Evolution*, 35(6): 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096
- Lestón, V. (2012). Biología y ecología de los simúlidos (Diptera: Simuliidae) del río Serpis (Alicante). (PhD Tesis. Universidad de Santiago de Compostela, Spain). Acceso: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=125069>
- Lestón, V., Díaz, J., Quirce-Vázquez, C., & Cobo, F. (2014). Distribución y selección de sustrato de los Simuliidae (Diptera) en el tramo medio del río Serpis (sureste de España). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 55, 153-158.
- López-Peña, D. (2018a). Contribución al conocimiento de la simulidofauna (Diptera, Simuliidae) en la cuenca hidrográfica del río Mijares. *Boletín de la Asociación española de Entomología*, 42(3-4), 193-216.
- López-Peña, D. (2018b). Simúlidos (Diptera: Simuliidae) de los ríos de la Comunidad Valenciana: Implicaciones en la salud pública y su control. (PhD. Tesis. Universidad de Valencia, España). Acceso: <https://roderic.uv.es/handle/10550/67930>
- López-Peña, D., & Jiménez Peydró, R. (2017). Updated checklist and distribution maps of blackflies (Diptera: Simuliidae) of Spain. *The Simuliid Bulletin*, 48, 1-45.
- López-Peña, D., García-Roger, E.M., & Jiménez-Peydró, R. (2020). Pre-imaginal black fly assemblages in streams of Eastern Spain: environmental and substrate requirements *Hydrobiologia*, 847, 1521-1538. DOI: 10.1007/s10750-020-04206-0
- Martínez Ruiz, R. E., & Portillo Rubio, M. (1999). Estudio faunístico y ecológico de los simúlidos (Diptera, Simuliidae) del río Cidacos a su paso por La Rioja. *Zubía*, 11, 61-80.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAAMA). (2013). *Protocolo de cálculo del índice IBMWP. CÓDIGO: IBMWP-2013*. Acceso: https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/IBMWP-2013_24_05_2013_tcm30-175292.pdf.
- Miliša, M., Stubbington, R., Datry, T., Cid, N., Bonada, N., Šumanović, M., & Milošević, D. (2022). Taxon-specific sensitivities to flow intermittence reveal macroinvertebrates as potential bioindicators of intermittent rivers and streams. *Science of the Total Environment*, 804, 150022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.150022
- Miró, G., Montoya, A., Checa, R., Gálvez, R., Mínguez, J. J., Marino, V., & Otranto, D. (2016). First detection of *Onchocerca lupi* infection in dogs in southern Spain. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-3. DOI: 10.1186/s13071-016-1587-1.
- Obregón Romero, D., Jordano Barburdo, D., Villar, R., & Flores, E. (2016). Implementation of a Simuliidae (Diptera, Nematocera) monitoring and control program in Córdoba (southern Spain). Poster communication. *VII International Simuliidae Symposium*, Zaragoza.
- Ofenböck, T., Moog, O., & Car, M. (2002). Does the Austrian blackfly fauna (Diptera: Simuliidae) support the typological approach of the EU water framework directive? *Limnologia*, 32, 255-272.
- Onder, Z., Yildirim, A., Duzlu, O., Arslan, M. O., Sari, B., Tasci, G. T., Ciloglu, A., Aydın, N. P., Inci, A., & Adler, P. H. (2019). Molecular characterization of black flies (Diptera: Simuliidae) in areas with pest outbreaks and simuliotoxicosis in Northeast Anatolia Region, Turkey. *Acta Tropica*, 199, 105149. DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.105149
- Puig, M. A., González G., & Soriano, O. (1984). Introducción al estudio de las comunidades macrobentónicas de los ríos asturianos: Ephemérotos, Plecópteros, Tricópteros, Simúlidos y Quironómidos. *Limnetica*, 1(1), 187-196.
- Reeves, W. K., Adler, P. H., Rätti, O., Malmqvist, B., & Strasevicius, D. (2007). Molecular detection of *Trypanosoma* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in black flies (Diptera: Simuliidae). *Comparative Parasitology*, 74(1), 171-175. DOI: 10.1654/4243.1

- Riaño, P., Basaguren A., & Pozo, J. (1993). Variaciones espaciales en las comunidades de macroinvertebrados del río Aguera (País Vasco-Cantabria) en dos épocas con diferentes condiciones de régimen hidrológico. *Limnetica*, 9(1), 18-28. DOI: 10.23818/limn.09.03
- Ricoy-Llavero, E., Ortega, F., Guerrero, F., & Márquez, F. J. (2020). Estudio de la comunidad y del patrón de colonización de simúlidos (Diptera, Simuliidae) en ecosistemas fluviales mediterráneos de montaña. *Limnetica*, 39(1), 233-243. DOI: 10.23818/limn.39.15
- Ruiz-Arrondo, I., Alarcón-Elbal, P. M., Figueras, L., Delacour-Estrella, S. A., Kotter, H., Pinal, R., & Lucientes, J. (2014). Expansión de los simúlidos (Diptera: Simuliidae) en España: un nuevo reto para la salud pública y la sanidad animal. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 54, 193-200.
- Ruiz-Arrondo, I., Garza-Hernández, J. A., Reyes-Villanueva, F., Lucientes-Curdi, J., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2017). Human-landing rate, gonotrophic cycle length, survivorship, and public health importance of *Simulium erythrocephalum* in Zaragoza, northeastern Spain. *Parasites & Vectors*, 10(1), 175. DOI: 10.1186/s13071-017-2115-7
- Ruiz-Arrondo, I., Hernández-Triana, L. M., Ignjatović-Ćupina, A., Nikolova, N., Garza-Hernández, J. A., Rodríguez-Pérez, M. A., Lucientes-Curdi, J. (2018). DNA barcoding of blackflies (Diptera: Simuliidae) as a tool for species identification and detection of hidden diversity in the eastern regions of Spain. *Parasites & Vectors*, 11, 463. DOI: 10.1186/s13071-018-3046-7
- Ruiz-Arrondo, I., Oteo, J. A., Lucientes, J., Muniesa, A., & de Blas, I. (2020). Surveillance of a Pest Through a Public Health Information System: The Case of the Blackfly (*Simulium erythrocephalum*) in Zaragoza (Spain) during 2009-2015. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(10), 3734. DOI: 10.3390/ijerph17103734
- Sánchez-López, P. F., Ruiz-Arrondo, I., Kotter, H., Pacheco Martínez, F., Segovia Hernández, M., & Gómez Campoy, M. E. (2018). Nuevos retos en gestión de vectores en salud pública: la mosca negra en Murcia (España). *Gaceta Sanitaria*, 32(2), 181-183. DOI: 10.1016/j.gaceta.2017.09.007
- Soriano Hernando, O., Álvarez Cobelas, M., Cirujano Bracamonte, S., Ruiz-Arrondo, I., Díaz-Alegre, J., & Aguado Abril, A. (2019). La influencia de la vegetación acuática en el desarrollo de las poblaciones de *Simulium erythrocephalum* (De Geer, 1776) (Diptera, Simuliidae) en Madrid: su relación con las emergencias masivas de mosca negra. *Revista Madrileña de Salud Pública*, 2(8), 1-8. DOI: 10.36300/remasp.2019.016
- Villanúa-Inglada, D., Alarcón-Elbal, P. M., Ruiz-Arrondo, I., Delacour-Estrella, S., Pinal, R., Castillo, J. A., & Lucientes, J. (2013). Estudio faunístico de los simúlidos (Diptera, Simuliidae) del río Flumen, Huesca (España). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 52, 212-218.
- Votýpka, J., Oborník, M., Volf, P., Svobodová, M., & Lukes, J. (2002). *Trypanosoma avium* of raptors (Falconiformes): phylogeny and identification of vectors. *Parasitology*, 125(Pt 3), 253-263. DOI: 10.1017/s0031182002002093
- Wallace, J.B., & Webster, J. R. (1996). The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Annual Review of Entomology*, 41, 115-139.
- Zhang, Y., Malmqvist, B., & Englund, G. (1998). Ecological processes affecting community structure of blackfly larvae in regulated and unregulated rivers: a regional study. *Journal of Applied Ecology*, 35(5), 673-686.