

Taxonomía molecular de *Anopheles* del Ecuador mediante ADN mitocondrial (Citocromo c Oxidasa I) y optimización por Parsimonia Máxima

Molecular Taxonomy of Anopheles from Ecuador, using mitochondrial DNA (Cytochrome c Oxidase I) and Maximum Parsimony optimization

Gabriela Arregui^{1,2}, Sandra Enriquez¹, Washington Benítez-Ortiz¹ & Juan-Carlos Navarro^{1,3,4*}

RESUMEN

La identificación de especies de *Anopheles* es compleja debido a la presencia de varios complejos de especies o especies crípticas cuyos ejemplares son de difícil distinción morfológica. Se corroboró o se corrigió la identificación de especies de *Anopheles* spp. capturadas en Ecuador, utilizando 393 secuencias de ADN mitocondrial, Citocromo Oxidasa I (COI) de 36 especies de Anofelinos neotropicales depositadas en GenBank y mediante la construcción de árboles filogenéticos usando parsimonia máxima. Se analizaron las identificaciones moleculares de cinco especies de *Anopheles* mediante los criterios de monofilia y topología del árbol, secuencias provenientes de la localidad tipo y la divergencia genética intra/inter especies. Las topologías de los árboles resultantes corroboran la identificación de secuencias/especies de *Anopheles* (*Anopheles*) *pseudopunctipennis* Theobald, *An. (Ano.) eiseni* Coquillett y *An. (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann; se corrige la identificación molecular de *An. (Nys.) rangeli* Gabaldón, Cova-García y López (no *oswaldoi*) y permanece en duda la identificación correcta de las secuencias relacionadas el grupo *Punctimacula*, hasta tener disponibles un mayor número de secuencias COI de especies relacionadas. La matriz de ADN-COI de 241 secuencias/haplotiposx36 especies construida para estos análisis resultará de utilidad para la identificación molecular de especies de Anofelinos de Ecuador y del Neotrópico con base en la porción de 520 pb entre 2.272 a 2.792pb de COI.

Palabras clave: *Anopheles*, taxonomía molecular, Citocromo Oxidasa I, Ecuador.

SUMMARY

The *Anopheles* species identification is complicated by the presence of several complexes of species and species whose specimens are difficult morphological distinction. We use 393 mitochondrial DNA sequences, Cytochrome Oxidase I (COI) of 36 Neotropical species of Anophelinae deposited in GenBank and by constructing phylogenetic trees using maximum parsimony the objective was to corroborate or correct the molecular identification of five sequences/species of *Anopheles* collected in Ecuador and also available in Genbank. We identified the taxonomic units, based on monophyly, phylogenetic species definition, tree topology, occurrence of sequences from the type locality and genetic intra/inter divergence of clades. The topologies of the resulting trees corroborate the identification of sequences of *Anopheles* (*Anopheles*) *pseudopunctipennis* Theobald, *An. (Ano.) eiseni* Coquillett y *An. (Nyssorhynchus) albimanus* Wiedemann, while the molecular identification of *An. (Nys.) rangeli* Gabaldón, Cova-García y López (not "oswaldoi") is corrected and remains in doubt the correct identification of related sequences for sequences belonging to *Punctimacula* group, until have available a greater number of COI sequences from related species. However according to the criteria of type locality, these are not *punctimacula* in sensu stricto. Finally, the matrix of alignment DNA-COI haplotypes sequences of 241x36 species built for these analyzes will be useful for molecular identification of Anophelinae species from Ecuador and the Neotropics based on the portion of 520 bp COI (between 2,272- 2,792 bp).

Key words: *Anopheles*, molecular taxonomy, Cytochrome Oxidase I, Ecuador.

INTRODUCCIÓN

La malaria o paludismo es considerada como uno de los principales problemas de salud

pública en América y en zonas tropicales del mundo. En el reporte 2014 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 98 países presentan transmisión malárica, con 3.3 billones de personas en riesgo,

¹ Centro Internacional de Zoonosis (CIZ), Universidad Central del Ecuador (UCE), Quito, Ecuador.

² Escuela Superior Politécnica del Ejército (ESPE). Carrera Ing. en Biotecnología, Quito, Ecuador.

³ Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Laboratorio de Biología de Vectores, Centro de Ecología y Evolución, Fac. Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁴ Proyecto Prometeo-Senescyt.

*Autor de correspondencia: juan.navarro@ciens.ucv.ve / jcnovac@gmail.com

de los cuales 1.2 billones en riesgo alto, mientras que en 2013, se estimó que 198 millones (124-283 millones) contrajeron la enfermedad con 584.000 fallecimientos (OMS, 2015). En Ecuador se registran miles de casos cada año, en 2011 se identificaron 1.232 casos para *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* (Orbe, 2012). Para el 2014, se reportaron 378 casos principalmente en la amazonía y en la Costa (Esmeraldas y Manabí), con un 57% de casos con debidos a *P. vivax* y 43 % para a *P. falciparum* (WMR, 2014). La incidencia del paludismo se relaciona con factores climáticos, geográficos y dificultades de orden económico o técnico (OMS, 2015) entre otras variables, la densidad poblacional de los mosquitos se eleva debido al incremento de los hábitats larvarios de origen antrópico (explotación minera y, petrolera que producen nuevos cuerpos de agua, ejem *An. darlingi* Root) y a la ausencia de un control efectivo del vector (Salazar *et al.*, 2006). Algunos autores han sugerido que algunas especies de *Anopheles* pueden transmitir parásitos de la malaria (*Plasmodium* spp.) en las zonas altas de Los Andes de América del Sur a causa del cambio climático, variación en el uso del suelo, construcción de nuevas carreteras, entre otros factores (Pinault & Hunter, 2012a).

En Ecuador la malaria es prevalente en la región costera y amazónica; sin embargo, registros históricos y actuales indican la presencia de vectores de la malaria en zonas altas de Ecuador. En los años 1940's se recolectaron larvas de *An. pseudopunctipennis* Theobald a lo largo de las vías del tren en construcción desde Guayaquil a Quito hasta una altitud de 3.200 m., siendo la especie más común y con mayor distribución altitudinal. En los valles de Imbabura y Pichincha también se registraron casos de malaria hasta una altitud de 2.500 m, sin embargo, nunca se ha reportado ningún caso en la ciudad de Quito a 2.800 m (Pinault & Hunter, 2012b). En el 2008, las provincias mayormente afectadas por malaria fueron: Esmeraldas, El Oro, Guayas, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos y, Manabí en la vertiente costera, y Orellana, Sucumbios y Morona Santiago en la vertiente amazónica; representando más del 85% del total de casos de paludismo en el país (Dávila & Bajaña, 2009).

El género *Anopheles* Meigen incluye la mayoría de las especies de la subfamilia Anophelinae con 444 especies descritas formalmente y alrededor de 40 identificadas como complejos de especies, que

esperan nombres formales (Harbach & Kitching, 2005; Harbach, 2007). El género *Anopheles* se subdivide en seis subgéneros: *Anopheles* s.s. Meigen (Cosmopolita), *Cellia* Theobald (Viejo Mundo), *Kerteszia* Theobald (Neotropical), *Lophopodomyia* Antunes (Neotropical), *Nyssorhynchus* Blanchard (Neotropical) y *Stethomyia* Theobald (Neotropical); sin embargo, Harbach *et al.* (2005), proponen un séptimo subgénero denominado *Baimaia* (*An. kyondawensis* Abraham) para una especie Oriental.

La identificación de especies de *Anopheles* es compleja debido a la presencia de varios complejos de especies o especies crípticas (González, *et al.*, 2010), cuyos ejemplares son de difícil distinción morfológica (Casas, 2004). La aplicación de la biología molecular mediante el uso de diversas secuencias de material genético y análisis filogenéticos han sido utilizadas para complementar, corroborar, y reconocer nuevas especies, estudiar complejos de especies y realizar cambios en la nomenclatura taxonómica, lo cual modifica las clasificaciones a medida que se incorpora nueva información morfológica y secuencias de ADN en GenBank (Bourke *et al.*, 2013; Pradeep *et al.*, 2013; Rozo-Lopez & Mengual, 2015; Ruiz-Lopez *et al.*, 2013; Wijit *et al.*, 2013 entre otros). Así, el estatus taxonómico y la sistemática de este género se encuentra aún sin resolver y en pleno desarrollo debido a problemas en la identificación de algunas especies, complejos de especies, especies crípticas y otros grupos de especies poco estudiadas taxonómicamente (Harbach, 2007; Loaiza *et al.*, 2013; Sallum *et al.*, 2002).

El género *Anopheles* se distribuye, en latinoamérica, principalmente en zonas de clima cálido y tropical de baja altitud (<500 m de altura). No obstante, se ha determinado la presencia de especies en tierras altas, principalmente del subgénero *Kerteszia* y de la Serie Arribalzagia del subgénero *Anopheles* (Pinault & Hunter, 2011; Rubio-Palis & Zimmermann, 1997; Sinka *et al.*, 2010; Zavortink, 1979). El subgénero *Kerteszia* se encuentran en zonas altas de América del Sur (Zavortink, 1979), ejemplo de éste grupo es *Anopheles neivai* Howard, Dyar & Knab, que ha sido registrada en tierras altas de Ecuador (Levi-Castillo, 1944, 1956; Sinka *et al.*, 2012; y datos no publicados de los autores). También se ha documentado una epidemia de malaria en tierras altas de Bolivia, registrando la introducción de *Plasmodium vivax* en una comunidad ubicada a

2.300 m de altura, cuya transmisión fue atribuida a *Anopheles pseudopunctipennis* (Rutar *et al.*, 2004).

Pinault & Hunter (2011, 2012a) realizaron diversas recolecciones de larvas *Anopheles* en las tres ecoregiones del Ecuador (con excepción de la llanura amazónica) con el reporte de cuatro especies: *Anopheles albimanus*, *An. pseudopunctipennis*, *An. punctimacula* Dyar & Knab y *Anopheles oswaldoi* (Peryassú). Sus hallazgos indicaron la presencia de vectores de la malaria en zonas bajas costeras del país y en localidades de piedemonte andino en la vertientes costa y amazónica (solo *An. oswaldoi*). Estos autores determinaron que las especies *An. albimanus*, *An. punctimacula*, y *An. oswaldoi* han invadido regiones andinas alcanzando altitudes máximas de 1.541 m, 1.906 m, y 1.230 m, respectivamente (Pinault & Hunter, 2011). Dichos hallazgos, son particularmente importantes debido a que se establece la presencia de vectores de la malaria en regiones superiores a los 1.200 m de altura, lugares donde no se efectúan los programas de erradicación del vector a cargo del Servicio Nacional de la Erradicación de la Malaria (SNEM) (Dávila & Bajaña, 2009).

La identificación de las larvas recolectadas por estos autores se basó en la utilización de claves morfológicas, y posterior corroboración molecular mediante la extracción y secuenciación del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa I (COI) realizando un alineamiento local mediante “Blast Search” en NCBI en GenBank, un método de búsqueda de identidad (similaridad simple) molecular aunque no filogenética.

Con base en las secuencias que se encuentran disponibles en GenBank, conociendo la incorporación de material de nuevas secuencias en esta base de datos de países cercanos/limitrofes al Ecuador, incluyendo nuevas especies descritas, y estando ante la presencia de especies isomórficas y complejos de especies como *albitarsis*, *oswaldoi*, *triannulatus*, Serie Arribalzagia, las cuales han sido reportadas por diferentes autores como: Brochero, *et al.* (2007); Conn *et al.* (2013); Dantur Juri *et al.* (2014); Estrada-Franco *et al.* (1993); Gómez *et al.* (2015); González *et al.*, (2010); Gutiérrez *et al.*, (2010); Lehr *et al.* (2005); Li & Wilkerson (2005); Loaiza *et al.* (2013); Moreno *et al.* (2013); Motoki *et al.* (2009); Orjuela *et al.* (2013); Quiñones *et al.*, (2001); Rosa-Freitas *et al.* (1998); Rueda *et al.* (2004); Ruiz *et al.* (2005); Ruiz-

López *et al.* (2010, 2012, 2013); Rubio-Palis *et al.* (2013); Sallum *et al.* (1999, 2008); Wilkerson *et al.* (2005); Wilkerson & Sallum (1999), nuestro objetivo fue corroborar el estatus o identidad taxonómica molecular de las secuencias de citocromo oxidasa I disponibles en GGenBank, correspondientes a las especies halladas en Ecuador, mediante inferencia filogenética con un método explícito y deductivo (Parsimonia Máxima) con un fin taxonómico alpha (identificación/taxonomía molecular) utilizando las secuencias de estas mismas especies y otros *Anopheles* de Suramérica y/o América Central, y al mismo tiempo construir una matriz alineada de secuencias de una porción del marcador COI ampliamente utilizado, que pueda ser utilizada para la identificación molecular de muestras del Ecuador y otras regiones de América del Sur.

Partimos aquí de la hipótesis, con base en la no verificación filogenética previa (Pinault & Hunter, 2011; 2012a) realizada solo por similaridad tipo “Blast Search” contra las secuencias de GenBank, que algunas secuencias pueden estar errónea o ambiguamente identificadas bajo la luz de las nuevas inclusiones de secuencias en GenBank y recientes cambios de nomenclatura en los grupos a los cuales pertenecen. Igualmente, una verificación filogenética puede resultar en la corroboración de otras secuencias en GenBank en la misma condición y rotulación errónea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las secuencias

Un total de 393 secuencias pertenecientes a 36 especies de la subfamilia Anophelinae (Culicidae) fueron utilizadas para la construcción de la matriz de alineamiento y análisis filogenéticos. Como grupo problema, se incluyeron las secuencias COI registradas de anofelinos colectados en Ecuador por Pinault & Hunter (2011, 2012a) en la sierra y costa: *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* (cinco secuencias), *Anopheles (Anopheles) punctimacula* (cinco secuencias), *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* (cinco secuencias), y *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* (tres secuencias). Como grupo de especies para comparación y referencia desde GenBank fueron incluidas un total de 375 secuencias COI de anofelinos registrados para América del Centro y del Sur. Todas las secuencias de ADN correspondientes

al gen Citocromo c Oxidasa I (COI), fueron obtenidas de GenBank en formato Fasta cuyo códigos de acceso y origen se muestran en la Tabla I.

Las secuencias para comparación con el grupo interno o grupo problema de estudio fueron especies pertenecientes a los subgéneros *Anopheles* y *Nyssorhynchus*: *An. costai*, *An. eiseni*, *An. intermedius*, *An. malefactor*, *An. mattogrossensis*, *An. neomaculipalpus*, *An. peryassui*, *An. squamifemur* (secuencia de Ecuador), *An. albitarsis s.l.*, *An. benarrochi*, *An. braziliensis*, *An. darlingi*, *An. konderi*, *An. nuneztovari*, *An. rangeli* y *An. trinkae*, así como especies del subgénero *Kerteszia*: *An. bellator*, *An. pholidotus*, *An. cruzi* y *An. homunculus* y usando la secuencia del género *Chagasia* (secuencia de Ecuador) como raíz y grupo de referencia (outgroup) en el análisis. En la Tabla I se muestran los datos taxonómicos, origen y autores.

Alineamiento de secuencias

El alineamiento múltiple de las secuencias basado en la búsqueda de homologías posicionales fue realizado mediante ClustalW (Higgins *et al.*, 1996) implementado en MacVector (MacVector Inc.) con altas penalidades de creación y extensión de gaps (GOP y GEP) de 15,0 cada uno de forma de buscar un alineamiento por homología.

La matriz final de alineamiento fue analizada en el programa ALTER (ALignment Transformation EnviRonment) para el colapso de haplotipos y la obtención de la matriz en formato Nexus (Glez-Peña *et al.*, 2010) de 241 secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos. El modelo de sustitución de pares de bases al cual se ajusta la matriz fue determinado mediante ModelTest incluido en el software Paup 4.0a146 (Swofford, 2002, actualizado 2015), utilizando los criterios de información de Akaike (AIC), Akaike corregido (AICc) y por el índice Bayesiano (BIC).

La Fig. 1, muestra el esquema del genoma mitocondrial de Anophelinae, con la porción del Citocromo c Oxidasa I y las regiones más abundantes de secuencias disponibles en GenBank: la región alineada en este trabajo entre 2.272 y 2.992 pb y la región usada en código de barras o “barcoding” entre 1.514 y 2.173 pb.

Análisis filogenéticos

La matriz resultante con haplotipos colapsados (241 secuencias) fue analizada mediante el software TNT “Tree analysis using New Technology” (Goloboff *et al.*, 2000) para la obtención de topologías filogenéticas que permitan la identificación molecular por clados monofiléticos apoyados por el consenso de mayoría y por valores altos de bootstrap. La búsqueda de árboles filogenéticos se realizó bajo el criterio de optimización de Parsimonia Máxima, mediante búsquedas heurísticas. Los taxa fueron adicionados al azar con 1.000 réplicas de construcción por cada adición, bajo el algoritmo de recorte y reconexión de árboles (TBR - Tree Bisection Reconnection), guardando sólo los árboles óptimos obtenidos en cada réplica. Se realizó un consenso de mayoría de los árboles retenidos y luego se realizó un análisis de bootstrap con remuestreo de la matriz de 1.000 pseudoréplicas para apoyo de grupos o clados monofiléticos (Felsenstein, 1985). Posteriormente, se realizó un repesado de los caracteres homólogos mediante el índice de consistencia re-calculado, resultando un árbol único. Las secuencias de *Chagasia* y *Kerteszia* actuaron como grupos de referencia (grupo externo o “outgroup”) para el enraizamiento del análisis sensu Sallum *et al.* (2000). El número de caracteres informativos para parsimonia, no informativos y constantes, así como los índices de consistencia (IC), de retención (IR) fueron calculados mediante Paup 4.0a146 (Swofford, 2012) y los valores de sitios polimórficos, variables, composición de bases y la matriz de divergencia con distancia genética p-no corregida mediante MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

Las unidades taxonómicas han sido determinadas tomando en consideración los siguientes criterios: 1) concepto filogenético de especie, basado en un clado o linaje que comparte caracteres apomórficos (sinapomorfias) heredados de un ancestro inmediato común, con un patrón de ascendencia-descendencia e inferido mediante el criterio de optimización de Parsimonia Máxima o cladístico para la construcción de hipótesis filogenéticas congruentes con la clasificación taxonómica natural; 2) la ubicación de las secuencias en la topología, congruente con clados o subclados monofiléticos apoyados por un porcentaje mayor a 70% en consenso de mayoría y un valor estadístico de remuestreo de la matriz o bootstrap mayor a

Tabla I. Lista de especies/secuencias utilizadas en los análisis. Se muestran los números de acceso y autores (referencia) de dichas secuencias.

Género	Subgénero	Especie	Número de secuencias	Origen	Códigos de acceso	Autores
<i>Anopheles</i>		<i>costai</i>	2	Colombia	HM022403, HM022404	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
			2	Colombia	JX205127, JX205128	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
		<i>eiseni</i>	1	Brasil	AF417716	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
			1	Brasil	AF417718	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
		<i>intermedius</i>	1	Costa Rica	JX212805	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Linton, Y.M., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
			1	Panamá	JX212804	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Linton, Y.M., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
		<i>mattogrossensis</i>	1	Colombia	JX205126	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
			2	Colombia	JX205124- JX205125	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
		<i>neomaculipalpus</i>	1	Panamá	JX212801	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Linton, Y.M., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
			1	Colombia	HM022405	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
		<i>periyassui</i>	2	Colombia	HM022407- HM022408	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
			2	Colombia	KC354819- KC354820	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.L.
		<i>pseudopunctipennis</i>	5	Ecuador	JN412834- JN412838	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
			1	Nicaragua	AF417721	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.

...continúa en la pág. 134

...viene de la pág. 133

1	Colombia	KC354818	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.L.
2	Colombia	JX205122, JX205123	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
5	Ecuador	JN412839- JN412843	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
1	Nicaragua	AF417719	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
10	Panamá	JX212783- JX212792,	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Sanjur, O.I., Rovira, J.R., Dutari, L.C., Linton, Y.M., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
4		JX212797- JX212800	
112	Colombia	FJ015158- FJ015269	Gutiérrez, L.A., Naranjo, N.J., Cienfuegos, A.V., Muskus, C.E., Luckhart, S., Conn, J.E. and Correa, M.M.
3	Colombia	KC354823- KC354825	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.L.
91	Costa Rica y Panamá	FJ516463- FJ516553	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Rovira, J. & Conn, J.E.
5	Ecuador	JN412826- JN412830	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
1	Nicaragua	AF417695	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
27	Panamá	HM030881- HM030907	Loaiza, J.R., Scott, M.E., Bermingham, E., Sanjur, O.I., Wilkerson, R., Rovira, J., Gutiérrez, L.A., Correa, M.M., Grijalva, M.J., Birnberg, L., Bickersmith, S. & Conn, J.E.
1	Argentina	DQ076204	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
1	Brasil	DQ076205	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
1	Paraguay	AF417696	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
1	Venezuela	DQ076234	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.

...continúa en la pág. 135

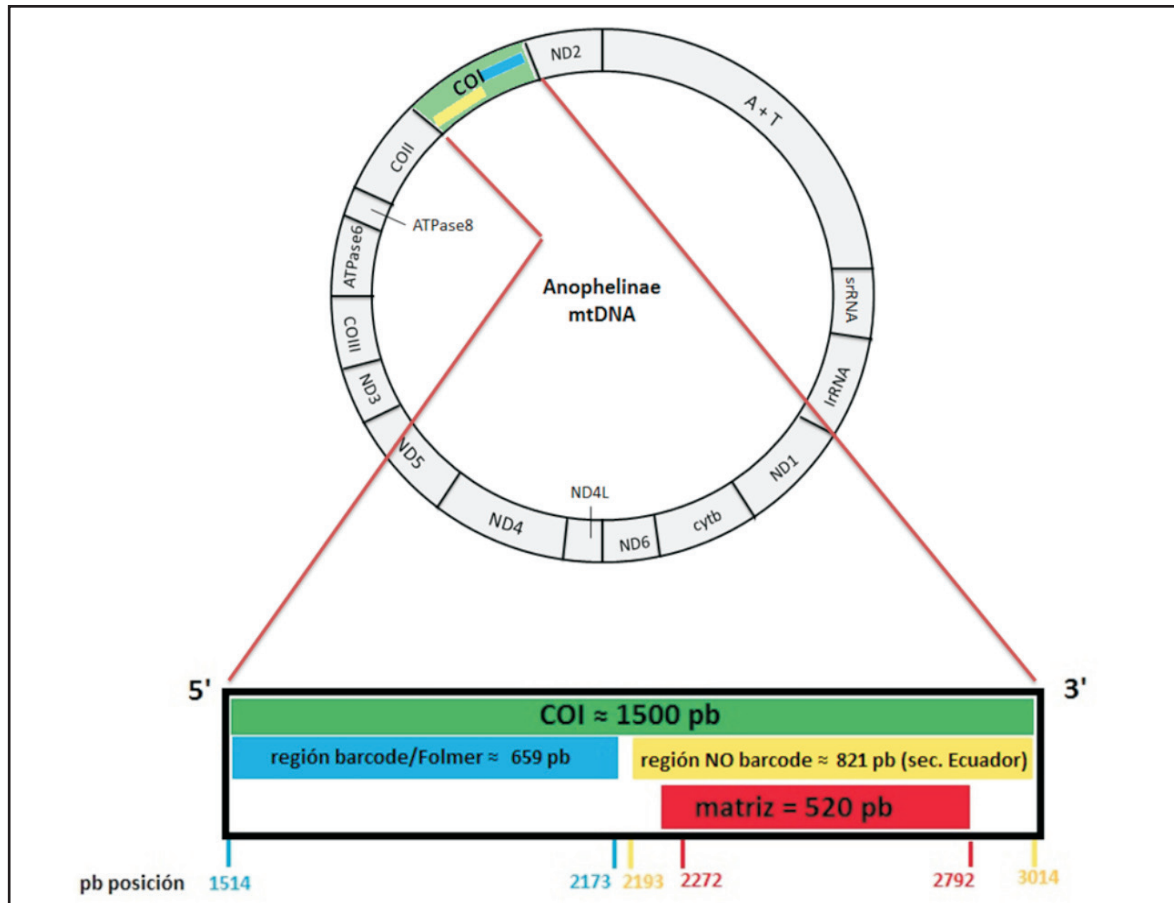
<i>albitarsis G</i>	2	Brasil	DQ076221, DQ076225	Lehr, M.A., Kipatrck, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>albitarsis H</i>	2	Brasil	DQ076222, DQ076223	Lehr, M.A., Kipatrck, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>albitarsis I</i>	2	Colombia	GQ153604, GQ153605	Gutierrez, L.A., Orrego, L.M., Gomez, G.F., Lopez, A., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M.
<i>aquasalis</i>	1	Colombia	KC354822	Herrera, M., Orjuela, L.I., Conn, J. & Quinones, M.I.
<i>benarrochi B</i>	14	Colombia	JX205097- JX205110	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.I.
<i>braziliensis</i>	1	Colombia	HM022398	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.I.
<i>darlingi</i>	1	Brasil	AF270932	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>deaneorum</i>	2	Brasil	DQ076227, DQ076229	Lehr, M.A., Kipatrck, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>dunhami</i>	1	Brasil	AF270931	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>janconnae</i>	2	Brasil	DQ076232, DQ076233	Lehr, M.A., Kipatrck, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>sp.nr.konderi</i>	7	Brasil	DQ784827- DQ784831, DQ784843, DQ784844	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>konderi of Sallum</i>	8	Brasil	DQ784839- DQ784842 DQ784845- DQ784848	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.

...continúa en la pág. 136

...viene de la pág. 135

<i>marajoara</i>	3	Brasil	DQ076216, DQ076218, DQ076220	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>nuneztovari</i>	1	Brasil	AF417700	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
	20	Colombia	JN255752- JN255771	Jaramillo, L.M., Gutierrez, L.A., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M.
<i>oryzalinnetes</i>	2	Brasil	DQ076211, DQ076215	Lehr, M.A., Kipatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E.
<i>oswaldoi</i>	3	Ecuador	JN412831- JN412833	Pinault, L.L. & Hunter, F.F.
<i>oswaldoi s.s.</i>	7	Brasil	DQ784832- DQ784838	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>oswaldoi A</i>	3	Brasil	DQ784849- DQ784851	Scarpassa, V.M. & Conn, J.E.
<i>rangeli</i>	5	Colombia	HM022390- HM022394	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
	5	Colombia	JX205117- JX205121	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
<i>triannulatus</i>	2	Colombia	HM022387, HM022388	Ahumada, M.L., Pareja, P.X., Buitrago, L.S., Herrera, M., Linton, Y.-M. & Quinones, M.L.
	1		JX852142	Rosero, D.A., Jaramillo, L.M., Gutierrez, L.A., Conn, J.E. & Correa, M.M.
	1		JX205111	Orjuela, L.I., Herrera, M., Erazo, H. & Quinones, M.L.
<i>Kerteszia</i>	1	Brasil	AF417704	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
<i>cruzii</i>	1	Brasil	AF417703	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
<i>Lophopodomys</i>	1	Ecuador	AF417723	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
<i>bathana</i>	1	Ecuador	AF417726	Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A. & Wilkerson, R.C.
Chagasia				
Total				393

Fig. 1. Esquema del genoma mitocondrial de Anophelinae, y la porción del gen citocromo oxidasa I en color verde. En azul, la región barcode/Folmer correspondiente a las secuencias que no lograron ser emparejadas en el alineamiento, la franja amarilla representa la región COI no barcode a la que pertenecen las secuencias utilizadas y la franja roja pertenece a la sección de la matriz alineada (2.272-2.792 pb).



50%, y congruente con la divergencia intra e inter secuencias/especies calculada por la matriz de distancia p-no corregida; 3) ubicación en un clado apoyado con las secuencias/especies en sensu stricto (s.s.), consideradas aquellas secuencias topotípicas o provenientes de la localidad tipo (localidad del Holotipo y de la descripción original), en caso de estar disponible.

RESULTADOS

Topologías de árboles y agrupamientos de taxa

La matriz alineada resultante fue de 241 secuencias de 520 pares de bases (caracteres) de ADNmt-COI (241 x 520). Del total de caracteres (520), 179 fueron informativos para parsimonia

(sinapomorfias), 14 no informativos (autapomorfias) y 327 constantes (no variables), mientras 191 fueron polimórficos, con una composición de bases A+T= 69,9% y C+G= 30,1%. El índice de consistencia fue de IC=0,40; de retención IR=0,84 y el recalculado RCI=0,62. La matriz de secuencias alineadas se ajustó a los modelos K81uf+I+G según los criterios de Akaike (ACI) y Bayesiano (BIC), y al modelo HKY+I+G de acuerdo al criterio de Akaike corregido (AICc).

La Fig. 2 muestra la hipótesis filogenética general (consenso de mayoría con 100% en todos los clados). La ubicación de las secuencias identificadas por Pinault & Hunter *op. cit.* se muestran en rojo lateralmente al grupo o clado señalado y se indica con una barra vertical con su correspondencia

taxonómica. Un análisis de Neighbor joining comúnmente utilizado en “barcoding” fue realizado y cuya topología (no mostrada) resultó igual que el árbol consenso de parsimonia.

En este árbol resultante se muestran grupos o clados que se identifican de la siguiente forma: Clado A con el taxón externo y basal *Chagasia batana*, luego el grupo interno con un 100% en consenso de mayoría y de bootstrap, internamente sigue el clado B con dos subclados, que incluyen el subgénero *Kerteszia* como más externo (60% bootstrap) y un clado (75% bootstrap) con *An. costai* de la Serie Arribalzagia.

Luego, y hacia lo más interno o derivado del árbol se observa clado D con *An. neomaculipalpus* (100% bootstrap), el clado E con las especies del Complejo *punctimacula*: *An. malefactor* (E1), *An. punctimacula* ss. (E3) y el grupo de secuencias identificadas como “*punctimacula*” (E2) por Pinault & Hunter (*op. cit.*).

Internamente al clado E, se encuentra el clado interno FG, con los subclados F con secuencias de *An. intermedius* y *An. “punctimacula”* (no *punctimacula* de Colombia), y el subclado hermano G con 15 subclados: G1 y G2 con secuencias de *An. punctimacula* (no *punctimacula* de Colombia) y *An. braziliensis*. Los clados G3 y G4 con secuencias de *Oswaldoi* s.l. y G5 con secuencias de *An. rangeli* y *An. oswaldoi* (no *oswaldoi* de Ecuador).

En lo más interno del árbol, se ubicaron los subclados G6, G7, G8 y G9 y el subclado hermano con los grupos G10, G11, G12 y G13. En el primer grupo, en G6 se ubican respectivamente secuencias de *An. benarrochi* B (Ruiz *et al.*, 2005) y una secuencia de *An. rangeli* (no *rangeli* de Colombia), el grupo G7 corresponde a secuencias de *An. triannulatus* s.l., G8 con *An. darlingi* y G9 con una representación de las 11 secuencias de *An. albimanus* de América Central, incluyendo Panamá, de Colombia y Ecuador. En este caso particular (*An. albimanus*), con fines de una mejor observación gráfica se utilizaron en la figura mostrada solo 11 secuencias de *albimanus*, incluyendo las cinco de Ecuador de Pinault & Hunter (2011, 2012a). Todas estas secuencias se ubicaron en el mismo clado con un 92% de bootstrap.

En el subclado hermano, el grupo G10 se ubicaron las secuencias de *An. albitarsis* s.l.,

incluyendo *An. albitarsis* s.s. (Argentina), *albitarsis* G, *daenorum*, *albitarsis* H, *marajoara*, *albitarsis* I, F, *janconnae* y *oryzalimnetes*. En el grupo G12 *An. nuneztovari* y en el G13 las secuencias de *An. pseudopunctipennis*, incluidas las secuencias de Ecuador de Pinault & Hunter *op. cit.* Las Fig. 3, 4, 5 y 6 muestran en detalle tipo “zoom” los clados y subclados descritos para la Fig. 1.

La divergencia promedio total fue de 0,08 (8%). La divergencia intra-especies mostró un intervalo entre 0-3%, mientras que inter (entre) especies/clados fue de 6-8 a 14%, lo cual se corresponde por lo reportado por Gómez *et al.* (2015) para COI en la Serie Arribalzagia, por Bourke *et al.* (2013), Ruiz-López *et al.* (2012, 2013), y McKeon *et al.* (2010) para otros grupos de anofelinos. Entre especies de Complejos fue: 3-7% entre *albitarsis* s.l. y 3-5% entre *oswaldoi* s.l. con secuencias de diferentes países.

Anophelinae del Ecuador

La revisión y búsqueda de secuencias y el análisis histórico de literatura permitió actualizar la lista de las especies de Anophelinae señaladas para el Ecuador (Tabla II), con un total de dos géneros, *Anopheles* con 22 especies y *Chagasia* con tres especies. El género *Anopheles* está representado por los subgéneros *Anopheles* (8 especies), *Nyssorhynchus* (6 especies), *Kerteszia* (5 especies) y *Lophopodomyia* (2 especies) (Levi-Castillo 1944, 1945a,b, 1956; Escovar *et al.*, 2014; Linton *et al.*, 2013; WRBU web page). Dos especies fueron descritas con localidad tipo en este país: *An. gomezdelarorrei* Levi-Castillo (Chiltazón, Carchi) y *An. trinkae* Faran (Puyo, Pastaza).

DISCUSIÓN

El análisis enraizado con el género *Chagasia* Cruz [*Ch. batana* (Dyar)] muestra las dos especies del subgénero *Kerteszia* (*An. bellator* y *An. cruzii*) como grupos de referencia, ubicados en la parte basal del árbol y en monofilia recíproca sensu Sallum *et al.*, (2002) con un 100% y 75% de bootstrap, respectivamente, con respecto al grupo interno mostrando los primeros resultados concordantes con la taxonomía actual. El índice de consistencia mostró un 40% de caracteres homólogos y 60% de homoplasia, y la retención de sinapomorfias en el árbol fue de 84% lo que indica la fortaleza en

Fig. 2 Árbol filogenético de 241 secuencias de GenBank mostrando los clados correspondientes a la identificación molecular por medio de Parsimonia Máxima y ADNmt-COI de las secuencias de Anopheles de Ecuador. En negrilla y rojo se señala la ubicación y corrección taxonómica de las secuencias de Ecuador.

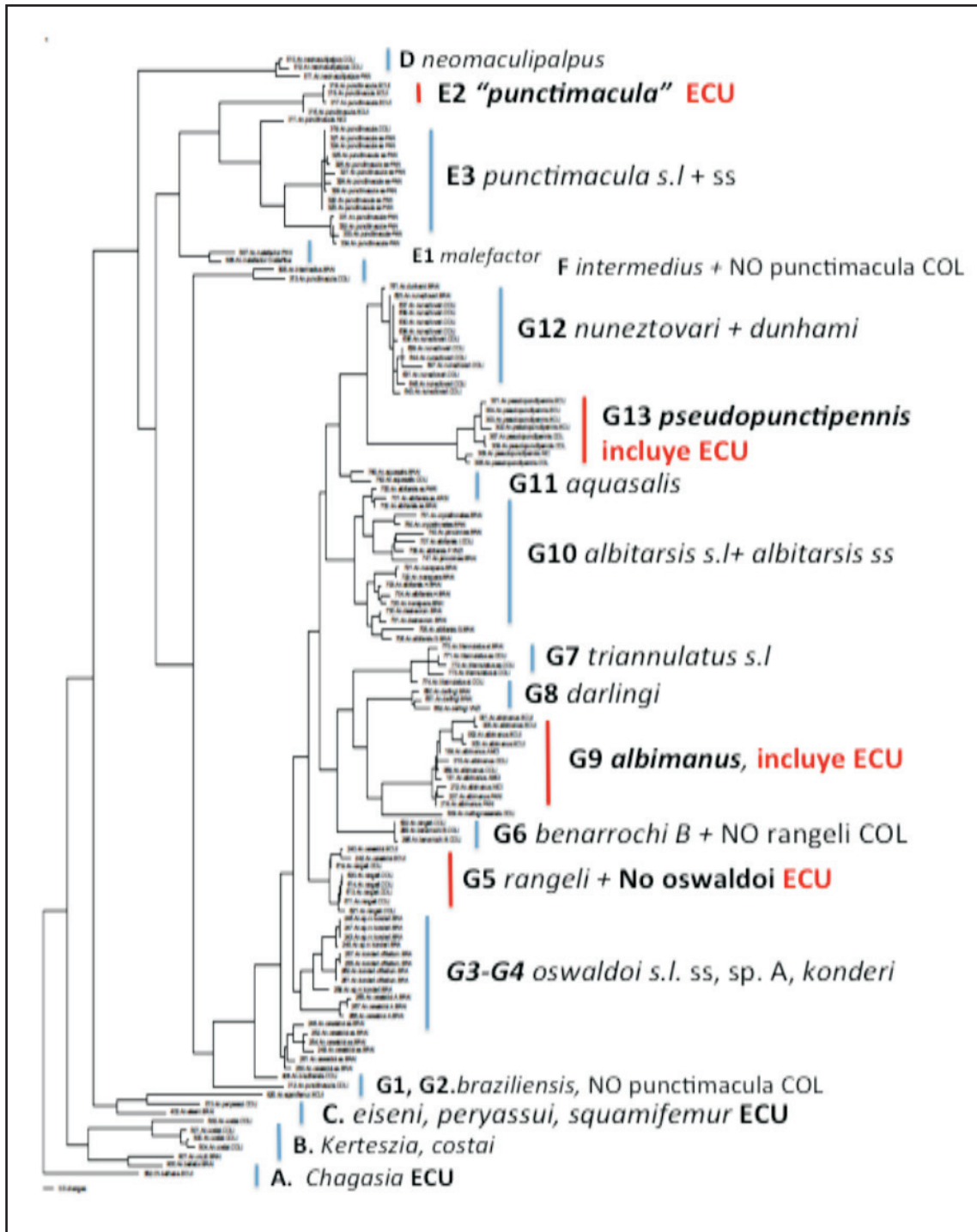


Tabla II. Lista actualizada de Anophelinae del Ecuador, basado en la literatura y secuencias en las secuencias disponibles en GenBank.

Género	Subgénero	Especie
<i>Anopheles</i>	<i>Nyssorhynchus</i>	<i>albimanus</i>
		<i>apicimacula</i>
		<i>aquasalis</i>
		<i>oswaldoi sp B</i>
		<i>nr konderi</i>
		<i>rangeli</i>
	<i>Kerteszia</i>	<i>bambusicolus</i>
		<i>neivai</i>
		<i>cruzii</i>
		<i>boliviensis</i>
		<i>lepidotus*</i>
	<i>Anopheles</i>	<i>calderoni</i>
		<i>darlingi</i>
		<i>eiseni</i>
		<i>fluminensis</i>
		<i>gomezdelatorrei*</i>
		<i>mediopunctatus</i>
<i>pseudopunctipennis</i>		
<i>punctimacula s.l.</i>		
<i>squamifemur</i>		
<i>triannulatus</i>		
<i>trinkae*</i>		
<i>Chagasia</i>	<i>bathana</i>	
	<i>bonneae</i>	
	<i>fajardi</i>	

(*) Especies con localidad tipo en Ecuador

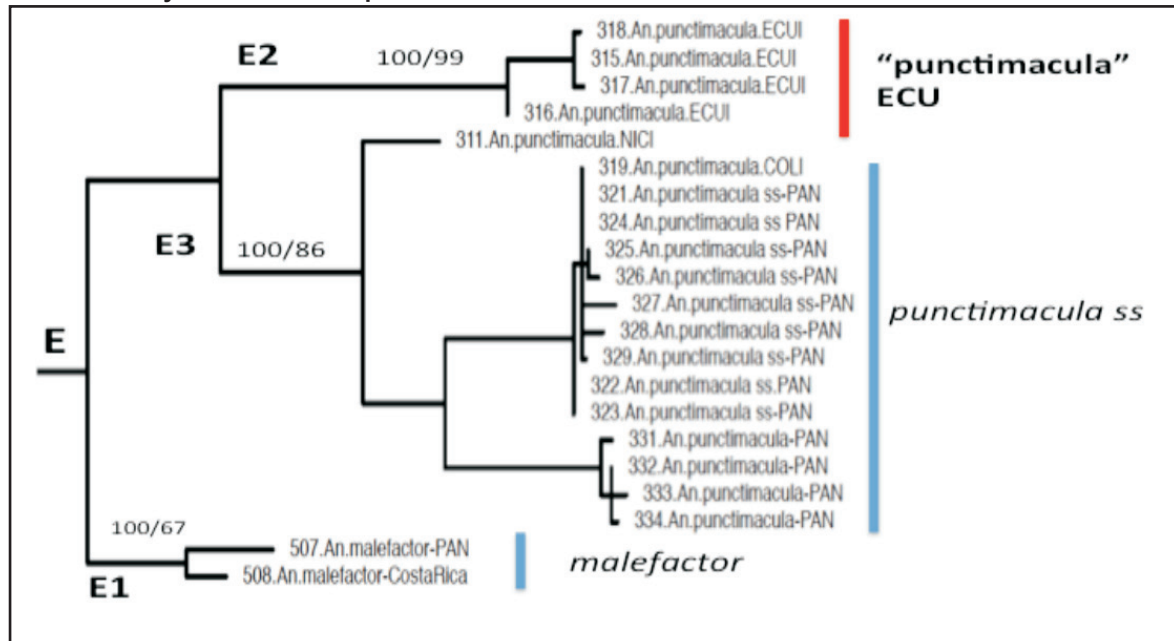
la estructura filogenética resultante, que sumada a los valores de remuestreo (bootstrap) y un 100% en todos los clados en el consenso de mayoría y el árbol repesado dan un fuerte apoyo a los clados formados como grupos monofiléticos.

De esta manera, aquellas secuencias/especies que se ubican en forma parafilética fuera del clado de las secuencias topotípicas son evidencia de secuencias provenientes de ejemplares erróneamente identificados y que ocurre en grupos pertenecientes a complejos de especies y de morfología de difícil identificación como es el caso del grupo *punctimacula* (Gómez *et al.*, 2015; y Loaiza *et al.*, 2013) coincidiendo con la hipótesis planteada.

En el grupo interno, los resultados obtenidos en los árboles muestran clados y subclados congruentes con la definición de especies filogenéticas y gran correspondencia con la nominación taxonómica con algunas excepciones en grupos de dificultad taxonómica o presencia de complejos de especies.

En la topología se muestran clados monofiléticos apoyados (con valores de bootstrap > 50% y de consenso de mayoría de 100%) con especies/secuencias que se corresponden con la denominación de la unidad taxonómica de especie. Las secuencias/especies de Ecuador producto de la publicación de Pinault & Hunter *op. cit.*, identificadas por alineamiento local mediante “Blast

Fig. 3 Detalle del Clado *punctimacula*. Ubicación de secuencias identificadas como *punctimacula* que corresponden a otra especie isomórfica (ver explicación en texto). Las muestras de Ecuador-*punctimacula* de Pinault & Hunter (2012), se ubican en el subclado no E2. Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.



Search” y depositadas en GenBank (*punctimacula*, *pseudopunctipennis*, *oswaldoi* y *albimanus*) muestran ambas situaciones: incongruencia y congruencia filogenética en su ubicación en la topología de los árboles obtenidos con las secuencias/especies topotípicas. De esta forma, las secuencias/especies de *An. punctimacula* y *An. oswaldoi* reportadas por Pinault & Hunter *op. cit.* se ubicaron en parafilia, respectivamente, con el clado topotípico para cada especie, demostrando su identificación incorrecta, mientras que las secuencias de *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus* quedaron incluidas en clados monofiléticos con las secuencias topotípicas para cada especie, confirmando una identificación correcta. Cada caso se explica a continuación:

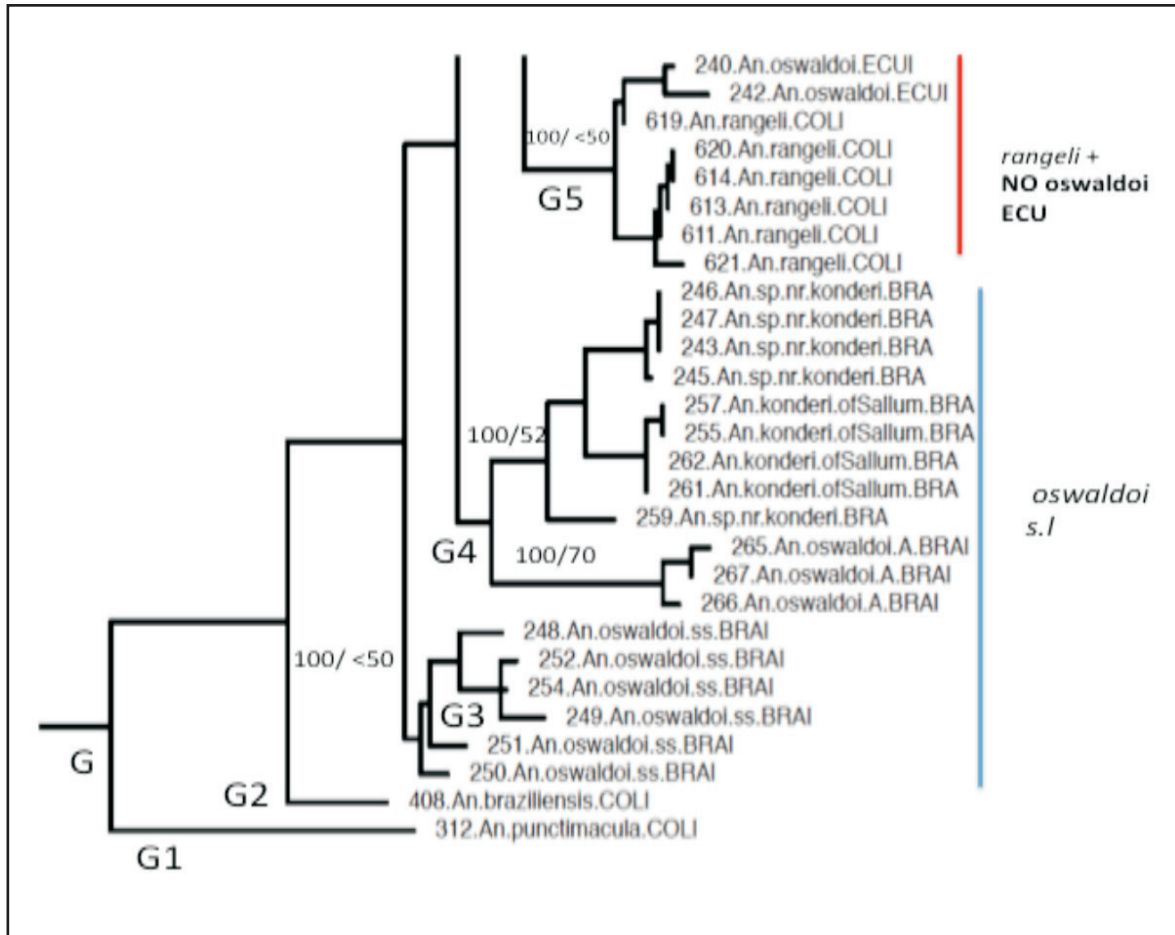
Serie Arribalzagia, Caso Anopheles punctimacula

Para esta especie es necesario observar los resultados obtenidos en los clados G (“*punctimacula*” de Colombia), E (secuencias de, Panamá, Ecuador, Nicaragua y Colombia, incluido *An. malefactor*) y F (“*punctimacula*” de Colombia). Las secuencias de *Anopheles punctimacula*, se ubican en parafilia en los clados G (G1), E (E2, E3) y F mostrados en las

Fig. 2 y 3. Partiendo de las secuencias topotípicas (obtenidas de ejemplares de la localidad tipo en Panamá), las secuencias de *An. punctimacula s.s.* deben ser consideradas las ubicadas en el subclado E3. Por esta razón, las secuencias ubicadas en el clado E2, correspondientes a Ecuador (Pinault & Hunter, *op. cit.*) pertenecen a otra unidad taxonómica no identificada, al igual que las secuencias de Colombia en los clados G1 (en clado hermano con *An. braziliensis*) y F (en el mismo clado con *An. intermedius*) más alejadas topológicamente (polifilia).

Las secuencias disponibles en GenBank para Ecuador se ubican en un clado único y hermano con secuencias de Panamá y Colombia y una secuencia de Nicaragua, ambas como subclado hermano de las secuencias de *An. malefactor* (E1). La divergencia calculada entre el subclado E2 (Ecuador) versus el subclado E3 (Panamá, Colombia y Nicaragua) está entre 8-11% como especies diferentes. Así mismo, la secuencia de Nicaragua que se ubica como basal en el subclado E3 tiene una divergencia de 8-9% vs el subclado E2 de Ecuador y de 10-13% con el mismo subclado E3 de Colombia y Panamá lo que indica la

Fig. 4. Detalle del clado G y sus subclados. Posición parafilética de las secuencias *oswaldoi* de Pinault & Hunter 2012, con respecto al clado *oswaldoi s.s.* (G3), las secuencias de Ecuador se corresponden con *Anopheles rangeli* (G5). Igualmente se muestra la secuencia parafilética de “*punctimacula*” de Colombia (G1). Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.

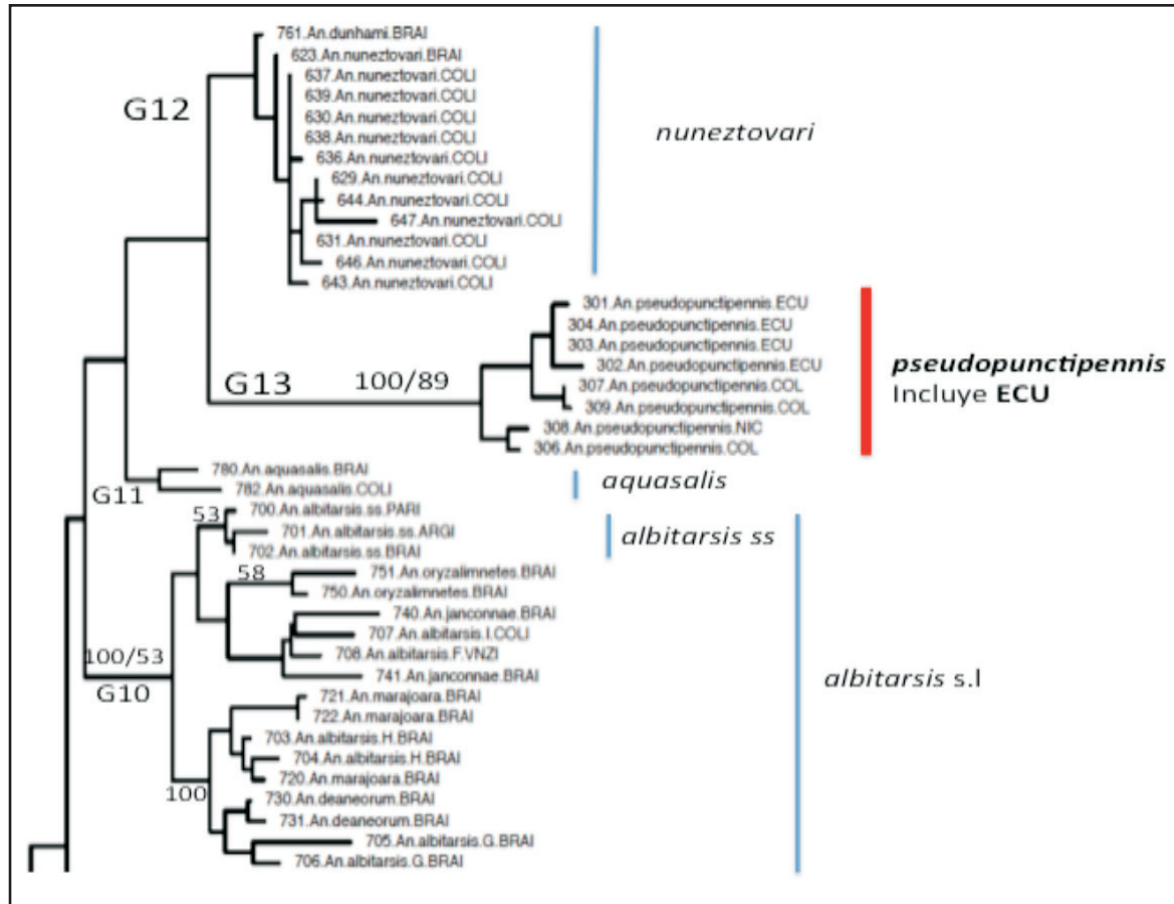


presencia de tres especies diferentes en el Complejo. La divergencia entre *An. malefactor* vs E2 y E3 es de 8-9% y 12-14% respectivamente, demostrando topológicamente y por divergencia la diferencia que llevó a esta especie ser rescatada de sinonimia de *An. punctimacula* (Wilkerson, 1990).

Las secuencias ubicadas en los clados G1 y F, adicionalmente a su posición parafilética, presentan una divergencia de 13% en el nivel de especies distintas (6-14%) al clado E del Complejo *punctimacula*. Una de las secuencias se ubican en un clado hermano de *intermedius* de Brasil (clado F) con una divergencia de 5% y la otra se encuentra basal en el clado G (G1) y cercana a *An. braziliensis* con un 11% de divergencia entre ellas.

El Complejo *punctimacula* presenta entidades de frecuente confusión en la identificación, señalado repetidamente por varios autores desde Wilkerson (1990) y más recientemente por Loaiza *et al.* (2013) y Gómez *et al.* (2015), en la cual *An. punctimacula* es frecuentemente confundida con *An. apicimacula*, *An. calderoni*, *An. neomaculipalpus* y *An. intermedius*, señalado por Gómez *et al.* (2015). La topología mostrada por Gómez *et al. op. cit.* (Fig. 4 pág. 11), con COI+ITS2 se asemeja a la topología aquí mostrada con los clados D (*An. neomaculipalpus*), E1 + E2 + E3 (*An. malefactor* + Ecuador + Nicaragua + *punctimacula s.s.*). Las secuencias de Ecuador y de Nicaragua, así como la secuencia del clado F (con *intermedius*) bien podrían corresponder a *An. calderoni* o *An. apicimacula*. La primera ha sido

Fig. 5. Detalle del clado G, mostrando la monofilia de secuencias de *Anopheles pseudopunctipennis* incluyendo las secuencias de Ecuador. De las secuencias de Ecuador. El clado muestra la monofilia de *albitarsis s.l.*, *An. nuneztovari* y *An. aquasalis*. Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.



identificada morfológica y molecularmente en el Ecuador (Wilkerson, 1991; González *et al.*, 2010), sin embargo las secuencias disponibles (“barcoding”) no pudieron ser alineadas de manera confiable en las secuencias COI “no barcoding” aquí utilizadas.

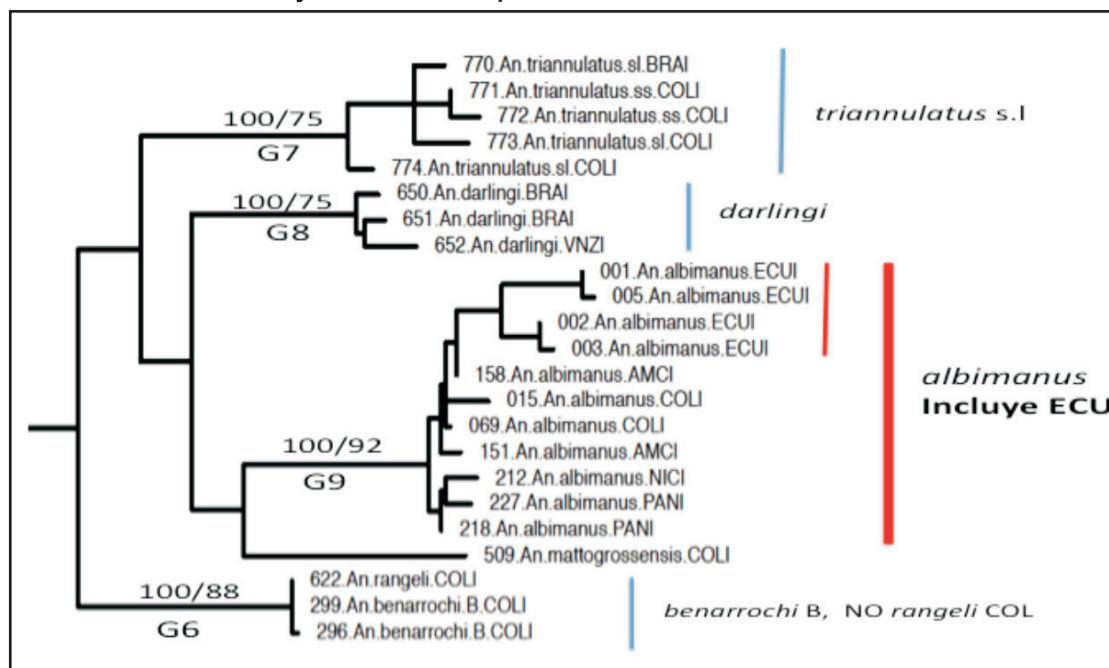
Las secuencias de “*punctimacula*” y *An. intermedius* del clado F, tienen adicionalmente, una divergencia del 5% descartando la posibilidad de ser coespecíficas. Por otra parte, la secuencia “*punctimacula*-Colombia” del subclado G1, se ubicó muy alejada con un 13% de divergencia correspondiendo a un error de identificación, sin embargo es interesante la ubicación única y aislada de la misma correspondiendo a una unidad taxonómica de la cual su identificación probable es de difícil inferencia con la información presente.

Subgénero *Nyssorhynchus*, *Caso* *Anopheles rangeli*, “no oswaldoi”

El subgénero *Nyssorhynchus* es conocido por presentar varios Complejos con especies de difícil identificación y grupos de especies bajo actual confusión, en algunos casos por no tener disponibles holotipos y/o ausencia de caracteres morfológicos diagnósticos claros (ejem. *An. benarrochi*), y en otros por poseer una alta variabilidad fenotípica y genotípica que hace compleja la determinación de unidades taxonómicas inequívocas.

Anopheles oswaldoi s.l. es una de estas especies, lo cual se evidencia en diferentes artículos recientes (Conn, *et al.*, 2013; Orjuela *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2005; Ruiz-López *et al.*, 2013; Rubio-

Fig. 6. Detalle del clado G, mostrando la monofilia de las secuencias de *albimanus*, que incluye las secuencias de Ecuador. El clado muestra la monofilia de *triannulatus s.l.* y *An. darlingi*. El subclado G6 muestra la secuencia “no *rangeli*” asociada con 0% de divergencia con *An. benarrochi* B. Valores arriba de la rama: % consenso mayoría / % bootstrap.



Palis *et al.*, 2013; Scarpassa, 2005; Scarpassa & Conn, 2006) y en donde especies como *oswaldoi*, *rangeli* y *benarrochi* están siendo confundidas sin tener una certeza de cual es la unidad taxonómica “correcta”. El complejo *An. oswaldoi* está conformado por al menos cuatro especies (Ruiz-López *et al.*, 2013), siendo su identificación generalmente dificultosa debido a la variación intra-específica y caracteres diagnósticos poco claros (o apomorfias putativas erróneas) entre especies en las fases adulta y en pupa, que hacen dudosa su identificación mediante claves morfológicas y se pueden producir identificaciones incorrectas. Tal es el caso de una variante morfológica de *An. benarrochi*, que en su estadio adulto es fácilmente confundible con *An. oswaldoi* (Quiñones *et al.*, 2001) y en otros casos la descripción de *benarrochi* y caracteres apomórficos putativos en las claves utilizadas puede llevar a confusiones con *An. aquasalis* (Faran, 1980; Navarro *et al.*, 2009), lo que puede ser producto de la misma variabilidad del complejo de especies y/o posibles sinonimias no esclarecidas.

La Fig. 4 (clado G), muestra igualmente parafilia en la ubicación de las secuencias de *An.*

oswaldoi disponibles en GenBank. Esta especie tiene como localidad tipo en Brasil, por lo que asumimos que el subclado G3 se corresponde con la presencia de *oswaldoi s.s.* (secuencias de Scarpassa & Conn, 2006, verificadas en Ruiz-López *et al.*, 2013). Este último grupo es basal a dos subclados compuestos por secuencias identificadas como *konderi* + “*oswaldoi* A” (G4) y más internamente al subclado G5 con secuencias de *An. rangeli* + “*An. oswaldoi* Ecuador”. La topología del árbol muestra las secuencias “*oswaldoi*” de Ecuador en el subclado hermano a las secuencias de *An. rangeli* de Colombia, no así con el Complejo *oswaldoi*, sin embargo la divergencia entre las secuencias fue de 3-6% sugiriendo la posibilidad de una entidad taxonómica diferente. No obstante secuencias de *An. nr. konderi* y *An. oswaldoi* B de Ecuador están disponibles (Ruiz-López *et al.*, 2013), éstas son de la porción “barcoding” y no fue posible realizar un alineamiento confiable.

Otra secuencia rotulada como “*rangeli*” se ubica en el subclado G6 junto a secuencias de *benarrochi* B (Fig. 5), ambas secuencias de Orjuela *et al.* (2013), lo que confirma la confusión morfológica

existente en algunos grupos de *Nyssorhynchus*. La divergencia calculada para las secuencias de este subclado fue de 0,0%, resultando idénticas, por tanto asumimos una identificación o rotulación errónea. Asumimos este subclado G6 como *An. benarrochi* B, aún cuando no será posible verificar su validez sin la realización de profundos estudios morfológicos y genéticos debido a la inexistencia del holotipo de *An. benarrochi* y la imposibilidad de coleccionar ejemplares en la localidad tipo en diferentes oportunidades debido a los profundos cambios ecológicos ocurridos en la zona (Navarro & Wilkerson datos no publicados). Esta especie ha sido señalada por diferentes artículos (Estrada *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2009; Orjuela *et al.*, 2013; Quiñones *et al.*, 2001, Ruiz *et al.*, 2005), sin embargo su identidad taxonómica tanto morfológica como molecular está aún por definir.

Casos *pseudopunctipennis*, y *albimanus*: baja variabilidad y congruencia fenotipo-genotipo.

Caso *An. pseudopunctipennis*

Es una especie de amplia distribución en el continente (Rueda *et al.*, 2004, Sinka *et al.*, 2010) y se encuentra con mayor frecuencia en las áreas montañosas (Shannon & Davis, 1927; WRBU, 2013), aunque su distribución altitudinal está entre el nivel del mar hasta por encima de los 3.000 m (Sinka *et al.*, 2010). Su estatus ha sido algo controversial con propuestas de tres poblaciones crípticas (Estrada-Franco, *et al.*, 1992; 1993a; 1993b). Coetzee *et al.* (1999) también señalan tres entidades incluyendo material de Granada (localidad tipo de la especie) y México como una tercera entidad, otros autores señalan un Complejo con dos especies (Casas, 2004; Manguin *et al.*, 1995), mientras que en una geografía más restringida como Argentina, demuestra ser una sola entidad evolutiva (Dantur-Juri *et al.*, 2014).

Las secuencias COI disponibles de *An. pseudopunctipennis* en GenBank provienen de Colombia y Nicaragua se ubican en el subgrupo G13 (Fig. 6) incluyendo las secuencias provenientes de Ecuador lo que confirma su identificación y la presencia en el país tal como ha sido señalado previamente (Levi-Castillo 1944, 1956). Las secuencias de Ecuador muestra una divergencia intra hasta el 1%, mientras que con las secuencias de Colombia y Nicaragua de 2 y 3%, lo que sugiere una variabilidad asociada posiblemente con distancia

geográfica. Lamentablemente, las secuencias COI de Argentina (Dantur *et al.* 2014) no alinearon de forma confiable por ser de una porción diferente de la aquí utilizada.

Caso *An. albimanus*

La especie *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* tiene un amplio intervalo de distribución dominando las zonas bajas y salobres desde México, Centro América, el Caribe y la Costa Pacífica de América del Sur (Guimarães, 1997; Knight-Stone, 1977, Sinka *et al.*, 2012) siendo muy abundante en la costa de Ecuador (datos no publicados de los autores, material de Colección CIZ-UCE). Se le considera una eficiente voladora, que logra dispersarse hasta 3 km desde un punto de liberación experimental (Faran, 1980). En Panamá, los adultos han logrado dispersarse al menos 19 km desde los sitios de cría, cubriendo tal distancia en una serie de vuelos cortos (Rozeboom, 1941), sin embargo no se ha demostrado evidencias morfológicas ni genéticas de posible diferenciación o subpoblaciones a lo largo de su distribución (Black *et al.*, 1988).

Este patrón se observa en el subclado G9 (Fig. 5), donde se muestra la ubicación de una representación (11 secuencias) de la totalidad de las secuencias de *albimanus* utilizadas (124 secuencias, árbol no mostrado) que incluye material proveniente de diferentes autores y desde América Central, Colombia y Ecuador continental y de las Islas Galápagos, sin mostrar estructura filogenética divergente, con fuerte politomía en el árbol total y con una divergencia entre 0-2% entre secuencias de América Central, Colombia y Ecuador (continental e Islas Galápagos) mostrando una alta homogeneidad genética y que evidencia una sola unidad taxonómica. Este resultado muestra la correcta identificación de las secuencias de Ecuador en donde esta especie comparte el mismo ambiente costero que otra similar como lo es *Anopheles aquasalis* Curry (datos no publicados de los autores, Colección CIZ-UCE), ubicadas en el clado distante G11 (Fig. 5) con secuencias de Colombia y Brasil.

Consideraciones finales

El uso de COI en filogenia y taxonomía molecular cada vez cobra más valor, incluyendo el uso mediante el método de "barcoding". En algunos casos y dependiendo del nivel jerárquico en que se trabaja la información puede ser útil para establecer

relaciones evolutivas, mientras que en otros casos es muy útil para establecer unidades taxonómicas (ejem. especies filogenéticas) como los casos que mostrados. Aquí demostramos cómo es posible aclarar límites entre especies diferentes mediante su ubicación en ramas o clados con monofilía recíproca, la topología COI, con base en las localidades tipo de las especies o secuencias disponibles, y con valores de divergencia inter e intra clados, sin asumir en las topologías de los árboles relaciones evolutivas entre grupos.

En este aporte también evidenciamos la existencia de secuencias depositadas en GenBank que no necesariamente están acordes con el rótulo o denominación taxonómica, las cuales en algunos casos han sido identificadas mediante “Blast search”, una herramienta de GenBank-NCBI que realiza alineamientos por %porcentaje de identidad o simple similaridad (no %porcentaje de homología como señalan muchos autores). Un efecto negativo de este proceso es que de no existir secuencias de especies cercanas evolutivamente, la búsqueda arroja una mayor identidad con las secuencias disponibles pero no con aquellas cercanas por homología real. En nuestro caso, las secuencias de dos especies colectadas en Ecuador y de difícil identificación morfológica como *Anopheles punctimacula* y *An. oswaldoi* resultaron ubicadas en nuestro análisis explícito en clados correspondientes a unidades taxonómicas diferentes.

Por esta razón, en análisis de taxonomía molecular, que tiene como objetivo la identificación de unidades taxonómicas, deben construirse hipótesis filogenéticas con métodos de homología (no de distancia) para la corroboración y ubicación correcta de las secuencias/especies a utilizar en el grupo de estudio.

En el presente estudio, corroboramos la presencia de secuencias/especies de *An. pseudopunctipennis* y *An. albimanus*, mientras que corregimos la identificación molecular de secuencias cercanas a *An. rangeli* (no *oswaldoi*) y permanece en duda la identificación correcta de las secuencias relacionadas el grupo *punctimacula* hasta tener disponibles un mayor número de secuencias COI de especies relacionadas. Sin embargo, de acuerdo al criterio de localidad tipo, estas no pertenecen a *An. punctimacula* sensu stricto.

Finalmente, la matriz de ADN-COI de 520 pb de 241 secuencias pertenecientes a 36 especies construida para estos análisis resultará de utilidad para la identificación molecular de especies de anofelinos de Ecuador y del Neotrópico con base en la porción 2.272 pb a 2.792 pb de Citocromo Oxidasa I.

Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que no existen conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Prometeo de Senescyt-Ecuador por el financiamiento a J. C. Navarro para su estadia e investigación en el CIZ-UCE, Ecuador. Este trabajo corresponde en parte a la Tesis de Grado de Ingeniería en Biotecnología de G. Arregui en ESPE, Quito, y también parte de la investigación en vectores de la Amazonía de Ecuador de la Unidad de Entomología Aplicada del CIZ. A los revisores anónimos, cuyas sugerencias mejoraron la versión final del manuscrito.

REFERENCIAS

- Black W. & Rai K. (1988). Genome evolution in mosquitos: intraspecific and interspecific variation in repetitive DNA amounts and organization. *Genet. Res.* **51**: 185-196.
- Bourke B. P., Oliveira T. P., Suesdek L., Bergo E. S. & Sallum M. A. M. (2013). A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors.* **6**: 111. doi: 10.1186/1756-3305-6-111.
- Brochero H. H., Li C. & Wilkerson R. C. (2007). A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitalarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreno, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **76**: 1113-1117.
- Casas M. (2004). Análisis de la estructura genética de las poblaciones de *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald de la zona identificada como de convergencia poblacional entre México y América Central. Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), 1-71.

- Coetzee M., Estrada-Franco J., Wunderlich C. & Hunt R. (1999). Cytogenetic evidence for a species complex within *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. Med.* **60**: 649-653.
- Conn J. E., Moreno M. E., Saavedra M., Bickersmith S. A., Knoll E., Fernandez R., *et al.* (2013). Molecular Taxonomy of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* (Diptera: Culicidae) and Malaria Epidemiology in Southern Amazonian Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **88**: 319-324.
- Dantur-Juri M. J., Moreno M., Prado M., Navarro J. C., Zaidenberg M., Almirón W., Claps G. & Conn J. (2014). Demographic history and population structure of *Anopheles pseudopunctipennis* in Argentina based on the mitochondrial COI gene. *Parasites & Vectors.* **7**: 423.
- Dávila J. & Bajaña F. (2009). *Programa de Vigilancia y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores: Paludismo*. Quito, Ecuador: Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Escovar J. E., González R., Quiñones M. L., Wilkerson R. C., Ruiz F. & Harrison B. A. (2014). Morphology of the larvae, male genitalia and DNA sequences of *Anopheles (Kerteszia) pholidotus* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **109**: 473-479.
- Estrada D. A., Quiñones M. L., Sierra D. M., Calle D. A., Ruiz F., Erazo H. F. & Linton Y-M (2003). Utilidad de la morfología de los huevos como un método indirecto para identificar *Anopheles benarrochi* Gabaldón, Cova García & López, *Anopheles oswaldoi* (Peryassú) y *Anopheles rangeli* Gabaldón, Cova García & López, (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomédica.* **23**: 388-395.
- Estrada-Franco J., Ma M., Lanzaro G., Gwadz R., Galvan-Sanchez C., Cespedes J., Vargas-Sagarnaga R., Rodriguez R. *et al.* (1992). Evidencia genética de un complejo de especie en *Anopheles pseudopunctipennis pseudopunctipennis*. *Bol. Sanit. Panam.* **113**: 297-299.
- Estrada-Franco, J., Lanzaro, G., Ma, M., Walker-Abbey A., Romans P., Galvan-Sanchez C., Cespedes J., Vargas-Sagarnaga R., Laughinghouse A., Columbus I., Gwadz R. *et al.* (1993a). Characterization of *Anopheles pseudopunctipennis sensu lato* from three countries of Neotropical America from variation in allozymes and ribosomal DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 735-745.
- Estrada-Franco J., Ma M., Gwadz R., Sakai R., Lanzaro G., Laughinghouse A., *et al.* (1993b). Evidence through cross mating experiments of a species complex in *Anopheles pseudopunctipennis sensu lato*: a primary malaria vector of the American continent. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 746-755.
- Faran M. (1980). Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus Section of the subgenus Nyssorhynchus of *Anopheles*. Contributions of the American Entomological Institute, **15**: 35-49.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.
- Glez-Peña D., Gómez D., Reboiro M., Fdez F. & Posada D. (2010). ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research.* **38**: 14-18.
- Goloboff P., Farris S. & Nixon K. (2000). TNT (Tree analysis using New Technology) (BETA) ver. xxx Published by the authors, Tucumán, Argentina.
- Gómez G. F., Bickersmith S. A., González R., Conn J. E. & Correa M. M. (2015), Molecular Taxonomy Provides New Insights into *Anopheles* Species of the Neotropical Arribalzagia Series. *PLoS ONE* **10(3)**: e0119488. doi: 10.1371/journal.pone.0119488.
- González R., Carrejo N., Wilkerson R., Alarcon J., Ormasa J., Ruiz F., Bhatia R., Loaiza J. & Linton Y. (2010). Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, **105**: 1001-1009.
- Guimarães J. H. (1997). *Systematic Database of Diptera of the Americas South of the United States*

- (Family Culicidae). Editora Plêiade, Fapesp. São Paulo, 110-114.
- Gutiérrez L. A., Orrego L. M., Gómez G. F., López A., Luckhart S., Conn J. E. & Correa M. M. (2010). A new mtDNA COI gene lineage closely related to *Anopheles janconnae* of the *Albitarsis complex* in the Caribbean region of Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**: 1019-1025.
- Harbach R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa.* **1668**: 591-638.
- Harbach R. E. & Kitching I. (2005). Reconsideration of Anopheline phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. *Systematics and Biodiversity.* **3**: 345-374.
- Harbach R. E., Rattarithikul R. & Harrison B. A. (2005). Baimaia, A New Subgenus For *Anopheles kyondawensis* Abraham, A Unique Crabhole-Breeding Anopheline In Southeastern Asia. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* **107**: 750-761.
- Higgins D., Thompson J. & Gibson T. (1996). Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology.* **266**: 383-402.
- Knight K. L. & Stone A. (1977). A catalog of mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae). *Thomas Say Found Entomological Society American.* **6**: 1-611.
- Lehr M. A., Kilpatrick C. W., Wilkerson R. C. & Conn J. E. (2005). Cryptic Species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) Complex: Incongruence Between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Identification and Analysis of Mitochondrial DNA COI Gene Sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **98**: 908-917.
- Levi-Castillo R. (1944). El complejo *pseudopunctipennis* en el Ecuador (Diptera: Culicidae). Universidad de Guayaquil. **1944**: 1-7.
- Levi-Castillo R. (1945a). *Anopheles pseudopunctipennis* in the Los Chillos valley of Ecuador. *J. Econ. Entomol.* **38**: 385-390.
- Levi-Castillo R. (1945b) *Los Anofelinos de la República del Ecuador*: Guayaquil, Ecuador: Artes Gráficas Senefelder C.A.
- Levi-Castillo R. (1956). *Provisional List of the Culicidae, Simuliidae, Phlebotomus and Culicoides of Ecuador*: Proceedings of the 10th International Congress of Entomology Montreal (1956) 1958, **3**: 867-872.
- Li C. & Wilkerson R. C. (2005). Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA internal transcribed spacer 2-based polymerase chain reaction primers. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 495-500.
- Linton Y., Pecor J., Porter C., Mitchell L., Garzón-Moreno A., Foley D., Pecor D. & Wilkerson R. (2013). Mosquitoes of eastern Amazonian Ecuador: biodiversity, bionomics and barcodes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **108 (Suppl. I)**: 100-109.
- Loaiza J., Scott M., Bermingham E., Sanjur O., Rovira J., Dutari L., Linton Y., Bickersmith S., & Conn J. (2013). Novel genetic diversity within *Anopheles punctimacula s.l.*: Phylogenetic discrepancy between the Barcode cytochrome c oxidase I (COI) gene and the rDNA second internal transcribed spacer (ITS2). *Acta Trop.* **128**: 61-69.
- Manguin S., Roberts D. R., Peyton E. L., Fernandez-Salas I., Barreto M., Fernandez Loayza R., et al. (1995). Biochemical systematics and population genetic structure of *Anopheles pseudopunctipennis*, vector of malaria in Central and South America. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **53**: 362-377.
- McKeon S. N., Lehr M. A., Wilkerson R. C., Ruiz J. F., Sallum M. A., Lima J. B., et al. (2010) Lineage divergence detected in the malaria vector *Anopheles marajoara* (Diptera: Culicidae) in Amazonian Brazil. *Malar J.* **9**: 271. doi: 10.1186/1475-2875-9-271 PMID: 20929572.
- Moreno M., Bickersmith S., Harlow W., Hildebrandt J., McKeon S. N., Silva-do-Nascimento T. F., et al. (2013). Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex

- patterns. *Parasit Vectors*. **6**: 47. doi: 10.1186/1756-3305-6-47.
- Motoki M. T., Wilkerson R. C. & Sallum M. A. (2009). The *Anopheles albitarsis* complex with the recognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **104**: 823-850.
- Navarro J. C., Hernández C., Rangel-Díaz G., Guerrero E., Rangel Y. & Arrivillaga J. (2009). Invalidación de autapomorfias putativas mediante análisis de filogenia molecular en *Anopheles* subgénero *Nyssorhynchus*. *Bol. Mal. Salud Amb*. **49**: 223-239.
- OMS (2015). *OMS-malaria*. Documento en línea. Disponible en: http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2014/en/. [Consultado el 10 de Noviembre de 2015].
- Orbe T. (2012). *SciDev.Net. El mosquito de la malaria llega a los Andes del Ecuador*. Documento en línea. Disponible en: <http://www.scidev.net/es/latin-america-and-caribbean/news/el-mosquito-de-la-malaria-llega-a-los-andes-del-ecuador-.html>. [Consultado el 10 de Marzo de 2013]
- Orjuela L. I., Herrera M., Erazo H. & Quiñones M. L. (2013). Especies de *Anopheles* presentes en el departamento del Putumayo y su infección natural con Plasmodium. *Biomédica*. **23**: 42-52.
- Pinault L. & Hunter F. (2011). New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malaria Journal*. **10**: 236-246.
- Pinault L. & Hunter F. (2012a). Larval habitat associations with human land uses, roads, rivers, and land cover for *Anopheles albimanus*, *A. pseudopunctipennis*, and *A. punctimacula* (Diptera: Culicidae) in coastal and highland Ecuador. *Frontiers in Physiology*. **3**: 1-9.
- Pinault L. & Hunter F. (2012b). Malaria in Highlands of Ecuador since 1900. *Emerging Infectious Diseases*. **18**: 615-622.
- Pradeep Kumar N., Krishnamoorthy N., Sahu S. S., Rajavel A. R., Sabesan S. & Jambulingam P. (2013). DNA Barcodes indicate members of the *Anopheles fluviatilis* (Diptera: Culicidae) species complex to be conspecific in India. *Mol Ecol Resour*. **13**: 354-361. doi: 10.1111/1755-0998.12076.
- Quiñones M., Harbach R., Calle D., Ruiz F., Erazo H. & Linton Y. (2001). Variante morfológica de adultos hembras de *Anopheles benarrochi* (Diptera: Culicidae) en Putumayo, Colombia. *Biomédica*. **21**: 351-359.
- Rosa-Freitas M. G., Lourenço-de-Oliveira R., de Carvalho-Pinto C. J., Flores-Mendoza C. & Silvano-Nascimento T. F. (1998). Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **93**: 651-55.
- Rozeboom L. (1941). Distribution and ecology of the *Anopheles* mosquitoes of the Caribbean region. *American Association for the Advancement of Science*. **15**: 98-107.
- Rozo-López P. & Mengual X. (2015). Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *Zookeys*. **513**: 39-64. doi: 10.3897/zookeys.513.9561.
- Rubio Y. & Zimmerman R. (1997). Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *J. Med. Entomol*. **34**: 499-510.
- Rubio-Palis Y., Ruiz-López F., Guzmán H., Sánchez V., Moreno J. E., Estrada Y., Bevilacqua M. & Cárdenas L. (2013). Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* B y *Anopheles (Nys.) albitarsis* F en la cuenca del río Caura, Estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb*. **53**: 68-72.
- Rueda L., Peyton E. L. & Manguin, S. (2004) *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald (Diptera: Culicidae): Neotype designation and description. *J. Med. Entomol*. **41**: 12-22.
- Ruiz F., Quiñones M. L., Erazo H. F., Calle D. A., Alzate J. F. & Linton Y. M. (2005). Molecular differentiation of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from

- southern Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **100**: 155-160.
- Ruiz-Lopez F., Linton Y. M., Ponsonby D. J., Conn J. E., Herrera M., Quiñones M. L., Velez I. D. & Wilkerson R. C. (2010). Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**: 899-903.
- Ruiz-Lopez F., Wilkerson R. C., Conn J. E., McKeon S. N., Levin D. M., Quiñones M. L., Pova M. M. & Linton Y. M. (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors.* **5**: 44.
- Ruiz-López F., Wilkerson R. C., Ponsonby D. J., Herrera M., Sallum M. A. M, Velez I. D., *et al.* (2013). Systematics of the *Oswaldoi* complex (*Anopheles, Nyssorhynchus*) in South America. *Parasites & Vectors.* **6**: 324. doi: 10.1186/1756-3305-6-324.
- Rutar T., Baldomar E. & Maguire J. (2004). Introduced *Plasmodium vivax* malaria in a Bolivian community at an altitude of 2,400 meters. *Am. J. Trop. Med.* **1**: 15-19.
- Salazar N., Fernández W., Iannac J., Morales A. & Espinoza M. (2006). Comparación de dos métodos de colecta para Anophelinos (cebo humano y trampa de luz CDC), durante la época seca y lluviosa, Yurimaguas, Perú 2005. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* **23**: 87-97.
- Sallum M. A. M., Wilkerson R. C. & Forattini O. P. (1999). Taxonomic Study of Species Formerly Identified as *Anopheles mediopunctatus* and Resurrection of *An. costai* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **36**: 282-300.
- Sallum M. A. M., Schultz T. & Wilkerson R. (2000). Phylogeny of Anophelinae (Diptera Culicidae) based on morphological characters. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **93**: 745-775.
- Sallum M. A. M., Schultz T., Foster P., Aronstein K., Wirtz R. & Wilkerson R. (2002). Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Systematic Entomology.* **27**: 361-382.
- Sallum M. A., Marrelli M. T., Nagaki S. S., Laporta G. Z. & Dos Santos C. L. (2008). Insight into *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) species from Brazil. *J. Med. Entomol.* **45**: 970-981.
- Scarpassa V. M. (2005). Isozyme similarity in *Anopheles oswaldoi sensu lato* (Diptera: Culicidae) from the Amazon Region, Brazil. *J. Med. Entomol.* **42**: 319-326.
- Scarpassa V. M. & Conn J. E. (2006). Molecular differentiation in natural populations of *Anopheles oswaldoi sensu lato* (Diptera: Culicidae) from the Brazilian Amazon, using sequences of the COI gene from mitochondrial DNA. *Genet. Mol. Res.* **5**: 493-502.
- Shannon R. & Davis N. (1927). La distribución del *Anopheles pseudopunctipennis* y su relación con el paludismo, en la Argentina. *Rev. Inst. Bacteriol.* **4**: 680-705.
- Sinka M. E., Rubio-Palis Y., Manguin S., Patil A. P., Temperley W. H., Gething P. W., *et al.* (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit Vectors.* **3**: 72. doi: 10.1186/1756-3305-3-72. Erratum in: *Parasit Vectors.* **4**: 210.
- Sinka M. E., Bangs M. J., Manguin S., Rubio-Palis Y., Chareonviriyaphap T., Coetzee M., *et al.* (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors.* **5**: 69. doi: 10.1186/1756-3305-5-69.
- Swofford D. L. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* **30**: 2725-2729.
- WijitA., SaeungA., BaimaiV., OtsukaY., Thongsahuan S., Taai K., *et al.* (2013). DNA barcoding for the identification of eight species members of the

- Thai Hyrcanus Group and investigation of their stenogamous behavior. *C R Biol.* **336**: 449-456. doi: 10.1016/j.crvi.2013.08.001.
- Wilkerson R. C. (1990). Redescription of *Anopheles punctimacula* and *An. malefactor* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **27**: 225-275.
- Wilkerson, R.C. (1991). *Anopheles (Anopheles) calderoni* n. sp. a malaria vector of the Arribalzagia Sries from Perú (Diptera: Culicidae). *Mosq. Syst.* **23**: 25-38, illus.
- Wilkerson R. C. & Sallum M. A. M. (1999). *Anopheles (Anopheles) forattinii*: a New Species in Series Arribalzagia (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **36**: 345-354.
- Wilkerson R. C., Foster P. G., Li C. & Sallum M. A. (2005). Molecular Phylogeny of Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Species Complex (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **98**: 918-925.
- WMR (2014). *World Malaria Report, 2014*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2015 en. http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_ecu_en.pdf.
- WRBU (2013). The Walter Reed Biosystematics Unit. Recuperado el 20 de Marzo de 2015, de http://wrbu.si.edu/speciespages_ano/ano_a-hab/analb_hab.html
- Zavortink T. (1979). Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A Review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contr. Am. Ent. Inst.* **9**: 1-54.

Recibido el 26/05/2015
Aceptado el 02/12/2015