



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Filogenia Intraespecífica y Variabilidad Genética en *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) utilizando secuencias de ADN mitocondrial**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Lorian Quintero como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutor: Dr. Juan Carlos Navarro (UCV)

CARACAS, VENEZUELA

MAYO – 2010

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE TABLAS Y APÉNDICES. ....	5
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	9
ANTECEDENTES .....	21
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVOS .....	29
General .....	29
Específicos .....	29
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
Área de estudio: .....	30
Colecta: .....	31
Procedimiento de laboratorio: .....	32
Cría, identificación y preservación de los organismos. ....	32
Extracción de ADN. ....	33
Amplificación de ADN por PCR. ....	34
Análisis de secuencias de COI y ND5. ....	37
RESULTADOS GENERALES .....	40
GEN COI: .....	42
GEN ND5: .....	52
PRUEBA DE HOMOGENEIDAD (COI+ND5) .....	62
DISCUSIÓN .....	67
CONCLUSIONES .....	81
BIBLIOGRAFÍA .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribución de <i>Culex quinquefasciatus</i> en el mundo.....	11
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Culex quinquefasciatus</i> Say.....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema de los genes mitocondrial.....	18
<b>Figura 4.</b> Árbol filogenético no enraizado basado en secuencias de ADN ribosomal ITS-1 y ITS-2 (1326 sitios alineados) para miembros del complejo <i>Culex pipiens</i> .....	23
<b>Figura 5.</b> Árbol filogenético basado en secuencias de ADN ribosomal ITS-1 y ITS-2 (1144 sitios alineados) para 4 subgénero y 14 especies de mosquitos pertenecientes al género <i>Culex</i> .....	24
<b>Figura 6.</b> Mapa del área de estudio (Venezuela).....	31
<b>Figura 7.</b> Minimum Spanning Network entre los haplotipos obtenidos con el gen mitocondrial COI.....	45
<b>Figura 8.</b> Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de 49 soluciones obtenidas para el gen COI. ....	49
<b>Figura 9.</b> Consenso estricto de los 49 árboles obtenidos por la búsqueda heurística para el gen COI.....	50
<b>Figura 10.</b> Árbol resultante del remuestreo o análisis de Bootstrapping para el gen COI en 53 taxa (31 haplotipos) de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	52
<b>Figura 11.</b> Minimum Spanning Network entre los haplotipos obtenidos con el gen mitocondrial ND5. Cada punto indica sustituciones de nucleótidos.....	55
<b>Figura 12.</b> Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de 80, obtenidas para el gen ND5.....	59
<b>Figura 13.</b> Consenso estricto de los 80 árboles obtenidos para el gen ND5. Caracteres tratados con igual peso.....	60
<b>Figura 14.</b> Árbol resultante del remuestreo o análisis Bootstrapping para el gen ND5 en 50 taxa (34 haplotipos) de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	62
<b>Figura 15.</b> Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de 60 soluciones obtenidas para la combinación de los genes COI y ND5. caracteres iguales.....	64

<b>Figura 16.</b> Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de 12 soluciones obtenidas para la combinación de los genes COI y ND5 Caracteres repesados.....	65
<b>Figura 17.</b> Consenso de la estricto de los 12 árboles obtenidos para la combinación de los genes COI+ND5. ....	66
<b>Figura 18.</b> Árbol resultante del remuestreo o análisis Bootstrap para la combinación de los genes COI+ ND5 en 44 taxa de <i>Culex quinquefasciatus</i> . ....	67

## ÍNDICE DE TABLAS Y APÉNDICES.

<b>Tabla 1.</b> Localidades muestreadas para la colecta de larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> y su información geoespacial.....	30
<b>Tabla 2.</b> Protocolo y condiciones para la reacción de amplificación del ADN mitocondrial (Región COI).....	34
<b>Tabla 3.</b> Protocolo y condiciones para la reacción de amplificación del ADN mitocondrial (Región ND5).....	35
<b>Tabla 4.</b> Número de muestras de <i>Culex quinquefasciatus</i> utilizadas para cada localidad de estudio.....	40
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de Guanina + Citosina y longitud del fragmento de ADNmt (COI) amplificado (en pares de bases) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> perteneciente a cada localidad de estudio.....	42
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de sitios polimórficos del gen COI, correspondientes a las poblaciones de <i>Culex quinquefasciatus</i> de las diferentes localidades estudiadas....	43
<b>Tabla 7.</b> Frecuencia de haplotipos para el gen COI, encontrados en un total de individuos de <i>Cx. quinquefasciatus</i> pertenecientes a los diferentes cementerios de localidades estudiadas.....	44
<b>Tabla 8.</b> Números de haplotipos para el gen COI y valores de diversidad de haplotipos, diversidad nucleotídica, estadístico de Hudson (Hst) y prueba de Tajima's D correspondiente a las poblaciones de cada localidad estudiada.....	47
<b>Tabla 9.</b> Número de soluciones, longitudes de los árboles (L), los índices de consistencias (IC), los índices de retención (IR) y los índices de homoplasias (IH), obtenidos en los análisis de parsimonia.....	48
<b>Tabla 10.</b> Porcentaje de Guanina + Citosina y longitud del fragmento de ADNmt (ND5) amplificado (en pares de bases) de <i>Cx. quinquefasciatus</i> perteneciente a cada localidad de estudio.....	53
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de sitios polimórficos del gen ND5, correspondientes a las poblaciones de <i>Culex quinquefasciatus</i> de las diferentes localidades estudiadas....	53
<b>Tabla 12.</b> Frecuencia de haplotipos para el gen ND5 encontrados en un total de individuos de <i>Cx. quinquefasciatus</i> pertenecientes a los diferentes cementerios de localidades estudiadas.....	54

<b>Tabla 13.</b> Números de haplotipos para el gen ND5 y valores de diversidad de haplotipos, diversidad nucleotídica y estadístico de Hudson ( $H_{ST}$ ) y valores de Tajima's correspondiente a las poblaciones de cada localidad estudiada.....	57
<b>Tabla 14.</b> Números de soluciones, longitudes de los árboles (L), los índices de consistencias (IC), los índices de retención (IR) y los índices de homoplasias (IH) obtenidos en los análisis de parsimonia.....	58
<b>Tabla 15.</b> Números de soluciones, longitudes de los árboles (L), los índices de consistencias (IC), los índices de retención (IR) y los índices de homoplasias (IH) obtenidos en los análisis de parsimonia para la combinación del gen COI+ND5....	63
<b>Apéndice 1.</b> Matriz de distancias pareadas (divergencia) por Kimura- 2 – parámetros, utilizando máxima parsimonia (Especies de <i>Culex quinquefasciatus</i> de diferente localidades estudiadas incluyendo los grupos externo, <i>Aedes aegypti</i> y <i>albopictus</i> y <i>Culex corniger</i> ). Gen COI.....	84
<b>Apéndice 2.</b> Matriz de distancias pareadas (divergencia) por Kimura- 2 – parámetros, utilizando máxima parsimonia (Especies de <i>Culex quinquefasciatus</i> de diferente localidades estudiadas incluyendo los grupos externo, <i>Aedes aegypti</i> y <i>albopictus</i> y <i>Culex corniger</i> ). Gen ND5.....	88

## **Filogenia intraespecífica y Variabilidad genética en *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) utilizando secuencias de ADN mitocondrial**

### **RESUMEN**

*Culex quinquefasciatus* Say, es una especie de mosquito perteneciente a la familia Culicidae, y forma parte del complejo Pipiens de *Culex*. Esta especie tiene amplia distribución en el mundo y en Venezuela se distribuye por casi todo el territorio nacional (Sutil, 1980; Del Ventura, 2008). Esta especie es acentuadamente antropofílica y es considerado un importante vector de varios virus así como de algunos parásitos, los cuales son mantenidos en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave.

Su amplia distribución y ocupación de diversos hábitats larvales de origen antropogénico podría sugerir la presencia de subpoblaciones geográficas que pudieran participar en forma diferencial en la transmisión de patógenos.

Análisis de las secuencias de porciones del ADN mitocondrial pueden ser de utilidad para delimitar la existencia de una estructuración poblacional de origen geográfico verificado por medio de métodos filogenéticos de las secuencias (filogeografía) y verificar hipótesis de variabilidad, homogeneidad genética y de estructuración filogenética. Se realizaron análisis genéticos haciendo uso de los genes mitocondriales COI (Subunidad I del Citocromo oxidasa) y ND5 (Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa) en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de nueve localidades del país (específicamente de cementerios locales), para establecer la presencia de una estructura subpoblacional y/o posibles linajes intraespecíficos, relacionados con áreas geográficas u otro mecanismos de diferenciación poblacional.

Los resultados obtenidos revelan niveles altos de variación genética tanto para el gen COI como para ND5. Particularmente para el gen ND5 los niveles de variación encontrada fueron altos en contraste a secuencias de ND5 de otras poblaciones de mosquitos, como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, mientras que el gen COI comparativamente con ND5 reveló niveles de variación menor dentro de *Cx. quinquefasciatus*.

Los análisis filogenéticos realizados con ambos genes sugieren que las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de las distintas localidades estudiadas mostraron una alta homogeneidad genética, reflejándose en una ausencia de clados monofiléticos entre poblaciones de los diferentes cementerios sin divergencia entre haplotipos, lo que demuestra la presencia de una sola entidad filogenética (monofilia) correspondiente a la especie *Cx. quinquefasciatus*. Se demostró que el fragmento del gen COI estudiado es más sensible en la definición de la filogenia de especies cercanas, así como a nivel de géneros y correlacionado con la clasificación actual, mientras que el gen ND5 por su alta variación es más útil para estudios poblacionales.

**Palabras clave:** ADN mitocondrial, Citocromo Oxidasa I, divergencia, monofilia, mosquitos, ND5 .variabilidad genética.



## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos (Díptera: Culicidae) son uno de los artrópodos hematófagos más comunes y de mayor importancia médica y veterinaria por ser transmisores de agentes patógenos que causan enfermedades a una gran variedad de especies de animales, afectando principalmente a los seres humanos y a las reses de cría . Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 3.000 especies de mosquitos en el mundo, y aunque las especies vectoras de estos constituyen una baja proporción, los problemas ocasionados por las enfermedades producidas por los agentes transmitidos por estos insectos son de gran importancia en salud pública y veterinaria (Travi y Montoya, 1994).

Los Culicidae son una familia de dípteros que se distribuyen en todas las regiones del planeta, excepto en la Antártica. Estos insectos tienen un ciclo de vida holometábolo con fases inmaduras acuáticas y se desarrollan en un amplio rango de comunidades bióticas, siendo más abundantes en zonas húmedas y tropicales. El género *Culex* pertenece a esta familia, formando parte de este género el complejo *Culex pipiens*, grupo en el que se encuentra *Culex quinquefasciatus* Say, (Harbach, 2007), especie que es objeto de esta investigación.

Los miembros del complejo *Culex pipiens* son vectores de algunos arbovirus y nemátodos que afectan al hombre y otros grupos animales (Rivas y col., 1995; Sabatinelli y col., 1994; Weaver y col., 1996). Particularmente *Cx. quinquefasciatus* es responsable de la transmisión de filarias como *Dirofilaria immitis* (Lai y col., 2000) y *Wuchereria bancrofti* (Farid y col., 2001), causante de una enfermedad parasitaria llamada Filariasis y también de los virus del Nilo Occidental y Encefalitis de San Luis en Estados Unidos (Lanciotti y col., 2000) y en Europa (Hubalek y Halouzka, 1999),

los cuales son mantenidos en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave. En áreas donde no existe riesgo de transmisión de estos agentes patógenos, esta especie también constituye un problema de salud pública, debido a dermatitis causadas por su picadura y las molestias por las altas densidades de población que alcanzan. (Peng y col., 1996, Salazar, 2004).

Las especies del complejo Pipiens se distribuyen a lo largo y ancho del planeta, principalmente *Culex pipiens* L., en las zonas templadas y *Culex quinquefasciatus* Say, que habita en las regiones tropicales y subtropicales, alcanzando isotermas de hasta 20°C (Savage y Miller, 1995), siendo considerada esta última acentuadamente antropofílica (Forattini y col., 2000)

Esta especie puede presentar un radio de vuelo de 500 metros, pero excepcionalmente puede alcanzar varios kilómetros (Cupp y col., 1994). Abunda principalmente en América y África tropical, Oriente Medio, sur de Asia, Nueva Guinea, Australia y el sur de Estados Unidos (Brewer y col., 1987; Almirón y col., 1995) (**Figura 1**); por lo que esta amplia distribución, tanto en el hemisferio Norte como en el Sur expone a esta especie a una variedad de climas y condiciones que son un reto para su supervivencia (Salazar y Moncada, 2004). En Venezuela, *Cx. quinquefasciatus* se distribuye por casi todo el territorio nacional, en áreas urbanas, suburbanas y rurales (Sutil, 1980; Del Ventura, 2008).



**Figura 1.** Mapa de distribución de *Culex quinquefasciatus* en el mundo.

A pesar de tener esta amplia distribución, *Cx. quinquefasciatus* posee una vagilidad (es decir capacidad de dispersión) intermedia; la fase adulta de esta especie tiene baja capacidad de vuelo, y sus huevos no son resistentes a la desecación por lo que el traslado hacia áreas lejanas puede darse como ocurre con otros insectos, mediante traslados por vehículos modernos (carros, aviones, etc.) en poco número de individuos, o en mayor número mediante el traslado de sus criaderos, que lo constituyen recipientes que contienen agua, de origen antropogénicos en los cuales las fases inmaduras (huevos, larvas y pupas) pueden ser trasladados siempre y cuando no ocurra pérdida del contenido por derrame o por desecación.

Este desplazamiento puede ser exitoso si los individuos superan la mortalidad asociada al trauma de traslado, caso muy diferente a lo que ocurre con sus pares urbanos, las especies invasoras de mayor éxito mundialmente como *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, cuyos huevos son resistentes a la desecación, lo que les permite permanecer en forma de latencia hasta seis meses en las paredes de un recipiente seco,

que luego de hacer contacto con agua de lluvia (recipientes de desecho) o incorporación por actividad humana (recipientes de almacenamiento como toneles, pipotes, tanques o se uso diverso como bebederos, floreros, etc.) eclosionan, dando origen a cientos de larvas que en gran proporción alcanzaran la fase adulta.

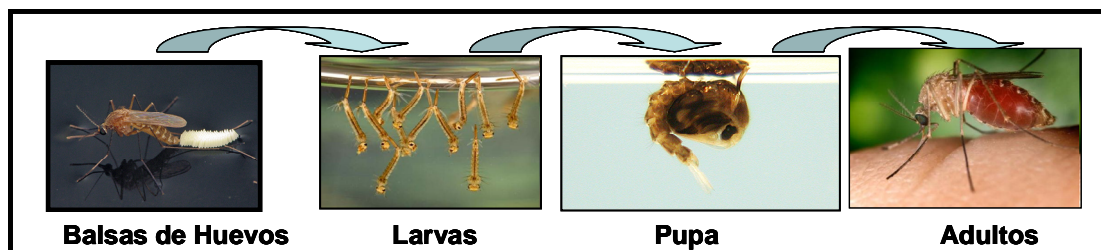
Esta diferencia notable de los *Aedes* urbanos con respecto a *Cx quinquefasciatus* en su ecología y fisiología les proporciona una mayor capacidad de dispersión y movilidad, razón por la cual *Cx quinquefasciatus* siendo también una especie exitosa en ambientes urbanos su movilidad es mucho más limitada. Sin embargo, una pregunta interesante a responder es ¿Por qué *Cx quinquefasciatus* sin tener esta ventaja eco-fisiológica fundamental para una especie invasora ha resultado tan exitoso como las especies de *Aedes* referidas?

Como se señaló arriba, esta especie tiene un ciclo de vida holometábolo (metamorfosis completa), los estadios inmaduros se desarrollan en depósitos de agua, ocupando diversos tipos de criaderos, constituidos principalmente por aguas con un alto grado de contaminación, abundante contenido de materia orgánica, detritos en proceso de fermentación, preferentemente sombreados, lénticos o semilóticos, cercanos al ambiente domiciliario y principalmente antropogénicos (Brewer y col., 1987).

Algunos de estos criaderos antropogénicos lo constituyen una diversidad de tipos de recipientes, entre los cuales los cauchos abandonados, floreros en hogares y en cementerios tradicionales son de los mas utilizados por esta especie. En los floreros de cementerios, *Cx quinquefasciatus* es uno de los principales ocupantes, junto a otras especies como *Cx corniger*, *Cx coronator*, *Cx dolosus*, *Aedes aegypti*, *Ae albopictus* y

*Toxorhynchites* sp., incluso con patrones de sucesión particular en donde *Cx quinquefasciatus* tiende a ocupar las fases terminales de descomposición de las flores, con el líquido putrefacto (Barrera y col., 1979, 1982; Vezzani, 2007).

Las hembras colocan sus huevos directamente en la superficie del agua, en forma de balsas (**Figura 2**), su posterior eclosión da origen a una larva de primer estadio, pasando luego por otros tres estadios que se diferencian en tamaño, luego a una fase de pupa con movilidad pero sin capacidad de alimentación hasta formarse el adulto o imago (volador) que coloniza y se alimenta en ambientes terrestres (Machado-Allison, 1982) y es de hábito nocturno, mostrando preferencia por sitios oscuros para reposar durante el día (Wen y col., 1997).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say.

La distribución geográfica tan amplia de esta especie y su amplitud de nicho en cuanto a los criaderos que las hembras seleccionan para depositar sus huevos y en los cuales ocurre el desarrollo de sus inmaduros pueden estar determinados por una capacidad fenotípica que es producto de su genotipo particular. Esto nos lleva a pensar que estudios genéticos y filogenéticos a nivel molecular podrían ser útiles para determinar características de la misma especie de mosquito en diversas localidades y/o condiciones macro-micro climáticas que puedan estar asociadas a variaciones a nivel genotípico.

La variabilidad genética producto de mutaciones referida a caracteres moleculares son cambios en uno o varios nucleótidos de la secuencia del ADN, estos cambios suelen ser eliminados, pero ocasionalmente pueden fijarse e incorporarse en todos los individuos de la población. La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética y una alta tasa de mutación implica un potencial mayor de adaptación en el caso de un cambio ambiental, permitiendo dentro de las variantes genéticas, una mayor probabilidad de poseer la variante adecuada y necesaria para adaptarse al reto ambiental particular.

Esta variabilidad genética entre poblaciones de diferentes localidades o incluso dentro de la misma población, puede estar asociada a diversos factores y/o procesos. Estos cambios podrían ser en pequeñas escalas temporales y grandes escalas espaciales producto de factores ecológicos intrínsecos a la localidad tales como la altitud, el clima, etc., o en escalas temporales grandes y espaciales pequeñas tales como:

**Efecto fundador o cuello de botella:** es un proceso que restringe a las poblaciones, un cuello de botella particularmente interesante es el que se produce cuando una población se establece con un pequeño número de fundadores, a veces tan sólo una pareja o con una hembra inseminada como es el caso de algunos insectos hembras que almacenan el esperma, la deriva genética aleatoria que sigue es a menudo llamada efecto fundador. Una población fundada por un pequeño número de individuos sufrirá cierta pérdida de variabilidad genética (alelos poco frecuentes), sin embargo en las primeras generaciones esto no es muy evidente (Futuyma, 1998).

**El Flujo Genético:** Este proceso sugiere que poblaciones naturales de una especie no se encuentran totalmente aisladas y el intercambio genético entre ellas ocurre en menor o mayor grado. El proceso de flujo genético supone que en ausencia de otros factores, estas poblaciones se homogenizan, lo que quiere decir que intercambian frecuencias del mismo alelo. Por lo tanto las poblaciones de una especie difieren genéticamente o son heterogéneas entre sí, sólo si este flujo de genes es lo suficientemente fuerte para contrarrestar las fuerzas que causan divergencia o heterogeneidad de las poblaciones como los procesos de deriva genética o selección natural. (Futuyma, 1998).

**El proceso de la Deriva Genética** es el cambio al azar en la frecuencias de los alelos o haplotipos de poblaciones de una especie, debido a la variación aleatoria en las tasas de supervivencia o reproducción en los diferentes genotipos, la frecuencia de un alelo puede fluctuar al azar hasta que dicho alelo (en una escala temporal generalmente grande esta va a depender del tamaño poblacional, pero en poblaciones pequeñas este tiempo es mas corto) se fija o se pierde en dicha población. (Futuyma, 1998).

**La Vicarianza:** proceso que presume que los eventos de especiación son causados por el aislamiento, producto de aparición de barreras, por tanto las relaciones filogenéticas de los linajes reflejan el tiempo relativo de separación entre las biotas o áreas. Por ende, se puede obtener una hipótesis biogeográfica acerca de las relaciones históricas entre dichas áreas. Este proceso no toma en cuenta la dispersión, asume que la especiación es siempre alopátrica, y por tanto las especies se forman en aislamiento geográfico que es el resultado de la fragmentación de la biota ocasionado por la fragmentación de las Placas Tectónicas (Zunino y Zullini, 2003).

Por otra parte, particularmente para este tipo de insectos, existen presiones antropogénicas que se conoce pueden influir en la genética de sus poblaciones como, por ejemplo, la aplicación intensiva de insecticidas que se considera un proceso ecológico reciente producto del actividad humana. Todos estos cambios pueden conducir a generar distintos linajes que pueden llegar a ser divergentes, observando así una estructura filogenética donde los eventos de cladogénesis pueden ser explicados a escala ecológica o evolutiva dependiendo del grado de divergencia nucleotídica y la tasa mutacional propia del taxón (Davies, 1975).

Una manera de observar si existen o no dichos cambios génicos, es a través de métodos biogeográficos, específicamente la Filogeografía, rama de la biogeografía que se refiere al estudio de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos a nivel intraespecífico mediante el uso de caracteres de ADNmt (Avice, 1987).

Una vez analizada la estructura filogenética de las poblaciones, se puede inferir cuales procesos pudieron influir sobre dicha estructura. La hipótesis de que existe una alta tendencia de variación **entre poblaciones** respecto a la variación **dentro de las poblaciones** permite usar el ADN mitocondrial para estimar filogenias de una misma población o filogenia intraespecífica (Hillis y col., 1996).

Entre las características moleculares que hacen útil al ADN mitocondrial están que, es una molécula circular covalentemente cerrada, de tamaño pequeño (ca. 16-20 kilobases), conformada por un total de 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN

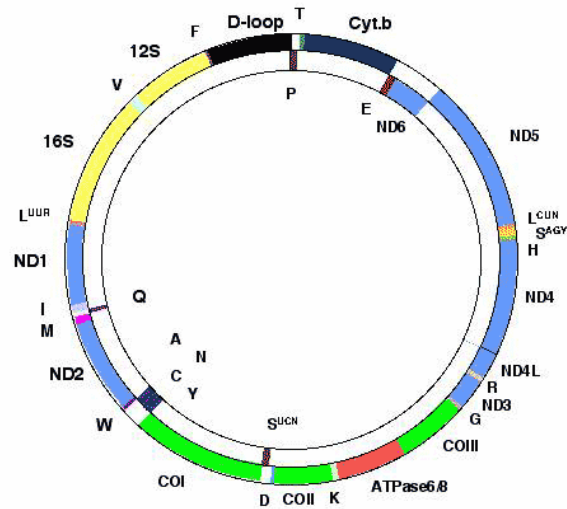


ribosomales y 22 ARN de transferencia), que controla la replicación y transcripción en la molécula y tiene un alto grado de polimorfismo y una tasa excepcionalmente alta de sustitución de nucleótidos en muchas taxa. La alta tasa de evolución a nivel de secuencias de nucleótidos, su prácticamente nula recombinación, gran variación intraespecífica, y más importante, su herencia estrictamente materna. (Krzywinski y Besansky, 2003) convierten al ADN en una molécula particularmente ventajosa para análisis filogeográficos a nivel intrapoblacional.

Los marcadores de ADN se han convertido en la herramienta más común y en una excelente opción para la medición de las diferencias genéticas entre e intra poblacionalmente. (Hoy, 2003). Tradicionalmente el ADN mitocondrial ha sido una elección como marcador para los estudios de variaciones genética entre especie de insectos tal como lo señalan Avise y *col.*, 1987; Harrison, 1989, Simón 1991; Liu y Bechenbach 1992 citados por Cook, 2005, Behura 2006, discutiendo que el ADN mitocondrial ha sido una fuente de datos ventajosa para numerosos estudios de filogenia molecular en insectos y más específicamente para mosquitos (Mitchell y *col.* 2002, Birungi y Mustermann, 2002, Mousson y *col.*, 2005, Hernandez, 2006, Scarpassa y Conn 2006, Brown y *col.*, 2009, Hasan y *col.*, 2009, Navarro y *col.*, 2009) y flebotomos (Arrivillaga y *col.*, 2002 ).

Debido a que el ADNmt es utilizado extensivamente como un marcador para hacer inferencia acerca de parámetros poblaciones (Avise, 1994) y que estudios realizados a nivel molecular sugieren que como marcador el ADN mitocondrial puede revelar patrones históricos y filogeográficos, así como también la tasa de flujo génico y puede por igual ser utilizado para definir genealogías maternas dentro de especies

(Simon y col., 1994; Conn y col., 1997), en este estudio se utilizará **COI** (Citocromo Oxidasa subunidad I) y **ND5** (Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa) como marcadores moleculares que ya han sido utilizados en otras especies de mosquitos, para inferir los patrones filogenéticos de *Cx. quinquefasciatus*.



**Figura 3.** Esquema de los genes mitocondriales

Debido a la mezcla de regiones altamente conservadas y variables que el gen COI presenta, lo hacen particularmente útil para estudios evolutivos (Cook y col., 2005). Este gen ha sido utilizado para amplificar secuencias en un gran número de especies. Este gen resulta ser un marcador útil para estimar las relaciones entre grupos de insectos, con una resolución taxonómica que varía desde órdenes hasta especies (De Brito y col., 2002).

La utilidad de usar el gen COI para elucidar las relaciones existentes de los dípteros a nivel de complejo, está bien documentada; por ejemplo, el complejo Buzzati *de Drosophila* (Spicer, 1995 citado en Dusfour y col., 2004), el complejo Longipalpis *de Lutzomyia* (Arrivillaga y Feliciangeli, 2001), el complejo Imicota de Culicoides (Linton

y col., 2002) y el complejo *Maculipennis de Anopheles* (Linton y col., 2001, 2003 citado en Dusfour y col., 2004) el complejo *Albitarsis de Anopheles* (Wilkerson y col., 2005) así como también en *Cx (Melanoconion) cedecei/taeniopus* (Hernández, 2006), y en definición taxonómica de especies filogenéticas en *Anopheles* (Navarro y col., 2009).

En el caso del otro marcador a utilizar, el gen mitocondrial ND5, es considerado uno de los genes más variables que codifican proteínas y ha sido utilizado en estudio de evolución de anofelinos (Besansky y col., 1997). Birungi y Munstermann (2002) utilizaron este gen para establecer los patrones de variación genética entre las poblaciones de *Aedes albopictus* de dos localidades y reexaminar el origen geográfico de las poblaciones resultando el ND5 un marcador un buen candidato para estudios filogeográficos.

Por tanto, el conocimiento de aspectos genéticos y biogeográficos de poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* producirán conocimientos acerca del comportamiento genético y evolutivo de poblaciones de insectos invasores exitosos y de amplia distribución y los patrones generales y específicos de poblaciones sometidas a diferentes factores de selección como también una base de información genética para la posible implementación de medidas de control en poblaciones de mosquitos de áreas urbanas.

En este trabajo se pretende caracterizar poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de diferentes localidades de Venezuela asociadas a criaderos de cementerios locales a partir de datos moleculares de los genes mitocondriales COI y ND5, considerando las diferencias *entre* y *dentro* de las poblaciones en cuanto a la variabilidad y diversidad de haplotipos, y estimando la estructura filogenética de dichas poblaciones.

Los resultados obtenidos nos permitirán sugerir los factores que puedan estar asociados tanto a la estructura filogenética como a la variabilidad y diversidad de haplotipos de las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* estudiadas como variables que pudiesen estar determinando el éxito de esta especie en la ocupación de ambientes urbanos.

## ANTECEDENTES

Aunque los mosquitos son una de las familias de insectos mejor estudiadas en morfología, ecología y sistemática, muchos vacíos existen desde el punto de vista genético y evolutivo. Un gran esfuerzo se ha realizado en grupos como *Anopheles* (transmisor de malaria) y *Aedes* (dengue y otras arbovirosis); sin embargo, en otros géneros, como en el caso del género *Culex*, la información es más deficitaria y dispersa.

El género *Culex*, con aproximadamente 800 especies descritas (Knight y Stone, 1977; Mustermann y Conn, 1997), es uno de los mayores géneros en los Culicidae y pocos trabajos parecen mostrar muchas inconsistencias en su clasificación actual (Navarro y Liria 2000; Navarro y Weaver, 2004). A nivel específico, *Cx. quinquefasciatus* y algunas especies del subgénero *Melanoconion*, han sido los más estudiados por razones de salud pública y veterinaria; sin embargo, muy pocos estudios filogenéticos a nivel molecular han sido realizados.

En cuanto a la metodología empleada en este trabajo y considerando otros grupos de dípteros diferentes al género *Culex*, se tiene como referencia los trabajos de:

**Birungi y Munstermann (2002)**, quienes evalúan la estructura genética de poblaciones *Aedes albopictus* (Díptera: Culicidae) usando secuencias del gen mitocondrial ND5, para evidenciar la invasión independiente dentro de Brasil y Estados Unidos, mediante el establecimiento de patrones de variación genética entre dichas poblaciones y reexaminando su origen. . Resultando en la aparición de nueve haplotipos diferentes.

**Mousson y col., (2005)**, establecen la filogrografía de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L) y *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) basándose en tres genes del ADN mitocondrial (Citocromo b, Citocromo oxidasa I, y la subunidad I de la NADH deshidrogenasa), permitiendo este trabajo demostrar que el análisis de los genes mitocondriales da una idea del origen de colonización de las poblaciones estudiadas y permite establecer el papel que ejercen los programas de control y actividades de comercio humano en la configuración de la composición genética de las poblaciones de mosquitos.

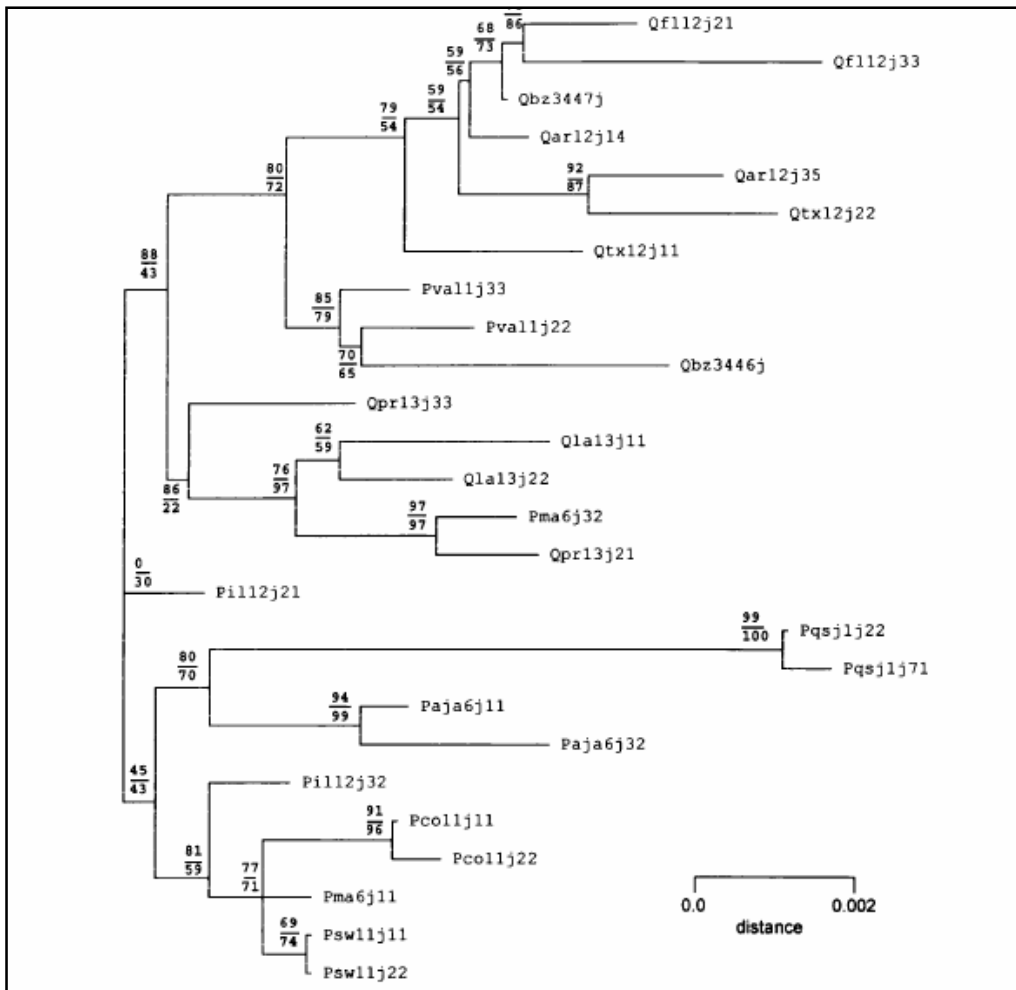
Por otra parte, **Scarpassa y Conn (2006)**, establecen la diferenciación molecular en poblaciones naturales de *Anopheles oswaldoi* sensu lato de la Amazonia brasileña usando secuencias del gen COI del ADN mitocondrial. Estimando así la variabilidad genética intra e interpoblacional de 4 poblaciones de *Anopheles oswaldoi* de la Amazonia brasileña. Este enfoque de análisis filogenético intrapoblacional es un ejemplo que ilustra el polimorfismo genético en COI y el uso de análisis intraespecíficos para estimar divergencia entre poblaciones.

Finalmente **Brown y col., (2009)** hacen una revisión del trabajo de **Birungi y Munstermann (2002)** y agregan tres nuevas poblaciones Cameroon, Hawaii e Italia. Identificando 4 nuevos haplotipos a los ya descrito y corroborando que la introducción de esta especie en Brasil ocurrió por separado a la introducción ocurrida en Hawaii.

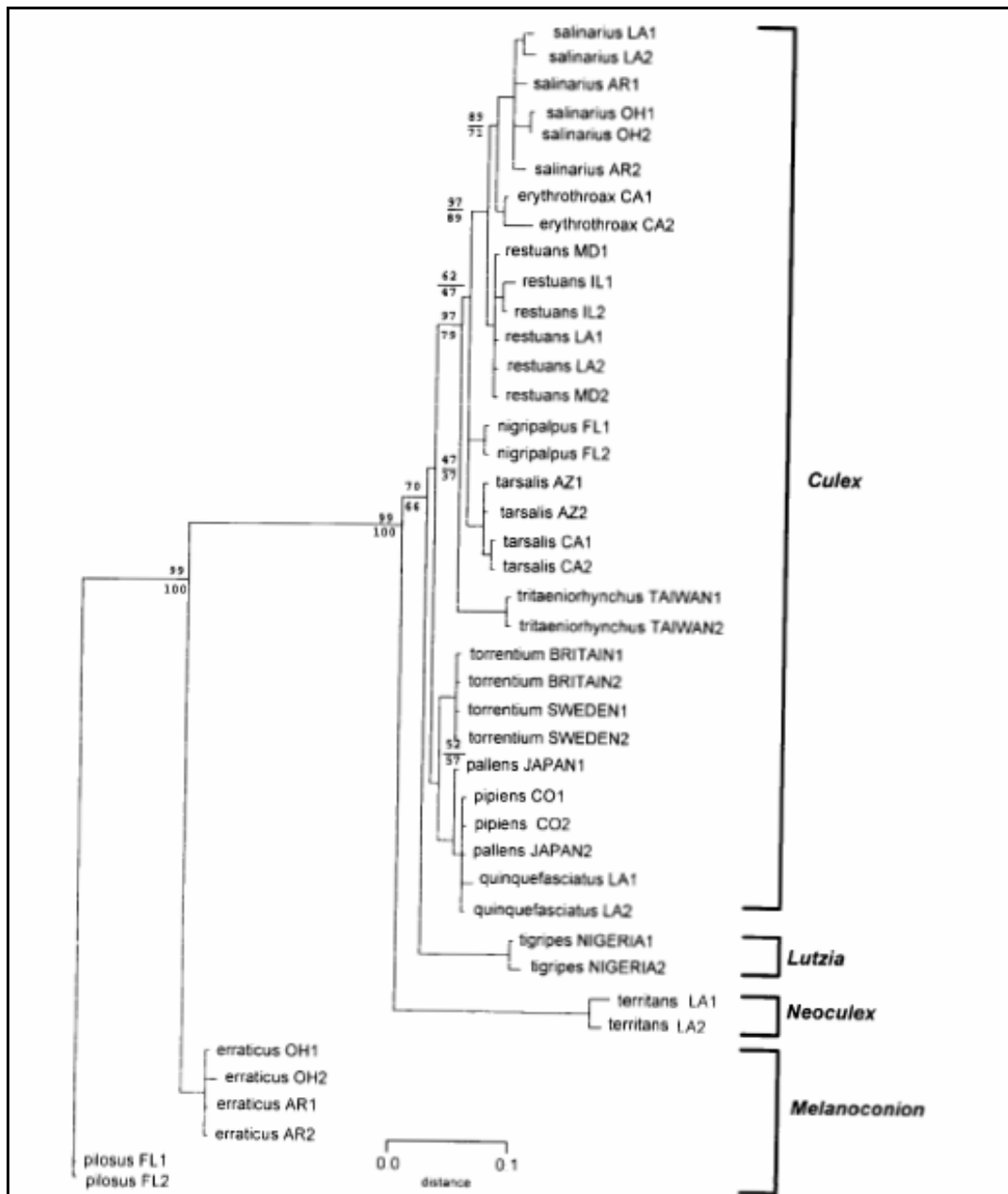
Particularmente, para *Cx quinquefasciatus*:

**Miller y col., (1996)** muestran un patrón de filogenia intraespecífica para las poblaciones de *Cx pipiens* s.l (en Estados Unidos) y *Culex* cercanamente relacionados,

utilizando el ITS del ADN ribosomal. Estos autores muestran que las entidades denominadas *Cx pipiens* y *Cx quinquefasciatus* en EUA no muestran una diferenciación genética (ITS ADNr) que apoye el estatus de dos especies distintas. Estos resultados parecen indicar una homogeneidad genética alta en este complejo de especies. (**Figura 4 y Figura 5**).



**Figura 4.** Árbol filogenético no enraizado basado en secuencias de ADN ribosomal ITS-1 y ITS-2 (1326 sitios alineados) para miembros del complejo *Culex pipiens*.



**Figura 5.** Árbol filogenético basado en secuencias de ADN ribosomal ITS-1 y ITS-2 (1144 sitios alineados) para 4 subgénero y 14 especies de mosquitos pertenecientes al género *Culex*. El árbol fue construido usando Neighbour – joining con Kimura 2- parámetros y enraizado con *Culex pilosus*.

**Hasan y col., (2009)** establecen la filogeografía de *Culex quinquefasciatus* de tres localidades de Bangladesh haciendo uso del gen mitocondrial COII, y el factor de elongación nuclear 1-alpha y acetilcolinesterasa-2 (ACE) como genes nucleares. Observándose una baja variación intraespecífica para las tres secuencias estudiadas. Las



secuencias del gen COII para *Cx quinquefasciatus* reveló sólo dos haplotipos compartidos por las poblaciones de las tres localidades, mientras que para el factor de elongación nuclear 1-alpha y ACE revelaron 14 y 33 alelos únicos respectivamente. Indicando estos resultados ausencia de estructuración genética entre poblaciones de Cq de distintas localidades, a pesar estar separadas por una distancia máxima de 150km. Revelando además que no hay barrera al flujo génico en mosquitos a distancias menores de 150km y que a pesar de las ambigüedades observadas dentro de *Cx. quinquefasciatus* esta especie es monofilética.

Finalmente **Sharma y col., (2009)**, establecen la variabilidad genética en poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* en diferentes localidades geográfica de la India a través amplificaciones al azar de ADN polimórfico (RAPD), indicando variación entre las poblaciones de las distintas localidades geográficas de la India. Mostrando también bajos y altos niveles de flujo de genes entre varias poblaciones y establecen que la condición geográfica ha emergido como una barrera, sugiriendo diferenciación genética incluso en el mínimo de distancia estudiada, concluyendo que estas barreras restringen el flujo genético entre dichas poblaciones. De esta manera se puede entender la variación con diferentes condiciones ecológicas, permitiendo desarrollar medidas efectivas para el control de vectores. Sin embargo, los autores sugieren que la variabilidad observada por marcadores RAPD necesita ser apoyada por otros marcadores moleculares tal como microsatélites y ADN mitocondrial.

Todos estos estudios constituyen la base que nos permitirá sustentar la hipótesis planteada en este estudio, debido a que no existe ningún estudio filogenético intraespecífico haciendo uso de los genes mitocondriales COI y ND5 en *Cx.*

*quinquefasciatus*. De esta forma, el análisis filogenético de las poblaciones de *Cx quinquefasciatus*, mostrará una primera aproximación del estatus genético poblacional de esta especie en Venezuela pudiendo establecer pautas para futuros estudios eco-genéticos con poblaciones de otras localidades inclusive fuera del país, así como estudios orientados al control de vectores.

## HIPÓTESIS

Siendo los criaderos de *Cx. quinquefasciatus* principalmente antropogénicos y urbanos y de ellos se evaluarán aquellos presentes en los cementerios -como los floreros- cuyas características son similares y delimitados a esas áreas de muestreo, que adicionalmente se conoce que esta especie tiene una capacidad limitada de vuelo y dispersión en fase acuática (inmaduros), su amplia distribución geográfica debe ser consecuencia principalmente producto de la actividad humana, promoviendo probablemente un flujo génico continuo entre las poblaciones de esta especie, en comparación con otras especies no urbanas, a excepción de los *Aedes* urbanos (*aegypti* y *albopictus*).

Debido a esto nuestra hipótesis se basa en que debemos *esperar alta homogeneidad genética entre las poblaciones de Culex quinquefasciatus, que se reflejaría en una estructuración filogenética con ausencia de clados monofiléticos, entre poblaciones de los diferentes localidades muestreadas (clados no resueltos o politomías), sugiriendo que no existe ninguna división o estructuración subpoblacional asociada a factores geográficos, representando así una sola entidad taxonómica (especie filogenética).*

Por el contrario, la presencia de variabilidad y divergencia entre haplotipos, podría generar una estructuración filogenética, con presencia de clados monofiléticos apoyados que sería indicio de influencia de factores geográficos-ecológicos (tales como el clima y la altitud), o asociación con procesos biogeográficos a escalas temporales mayores, como la Vicarianza, Deriva Genética y también la influencia de la actividad

humana actuando sobre los procesos de flujo génico y la presión ejercida por aplicación de insecticidas.

**Este razonamiento nos lleva a la siguiente hipótesis:**

Debe existir una alta homogeneidad genética entre las poblaciones de *Culex quinquefasciatus*, sin mostrar divergencia entre las mismas; sin embargo una alta heterogeneidad intrapoblacional, lo que quiere decir poblaciones con gran variabilidad genética y presencia de diferentes haplotipos. Filogenéticamente, esto debe reflejarse en una ausencia de estructuración filogenética propiamente dicha; es decir, presencia de una gran politomia (clados no resueltos) entre las secuencias de las poblaciones, que no nos permitiría explicar relaciones filogenéticas entre dichas poblaciones asociadas a factores de distancia geográfica ni otro factor de divergencia o separación.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la variabilidad y divergencia genética mediante la estimación de estructuración filogenética entre las poblaciones de *Cx quinquefasciatus* provenientes de nueve localidades de Venezuela y sugerir posibles factores (ecológicos o evolutivos) que mejor expliquen los resultados obtenidos.

### **Específicos**

➤ Crear una base de datos moleculares con secuencias de genes mitocondriales COI y ND5 de los ejemplares de las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* muestreadas para esta investigación.

➤ Determinar la variación genética y haplotípica inter e intra poblacional respectivamente, de ejemplares de *Cx quinquefasciatus* provenientes de los cementerios muestreados y de otro criadero diferente a los floreros de dichos cementerios.

➤ Inferir los procesos que podría estar determinando las relaciones intra e interpoblacionales de *Culex quinquefasciatus*, producto de las relaciones de filogenia intraespecífica resultantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio:

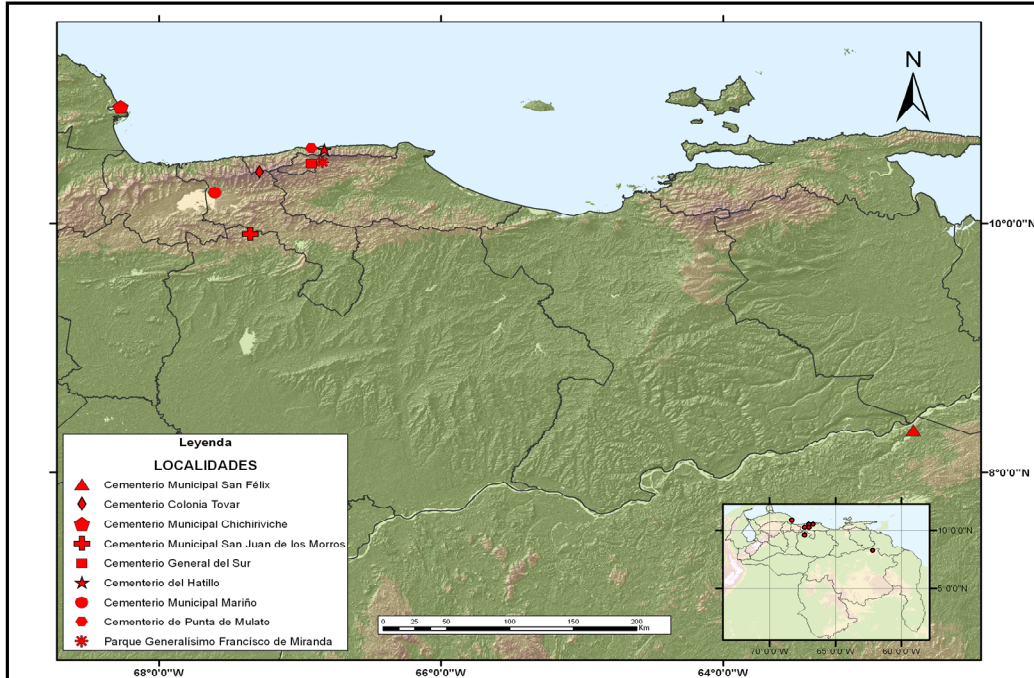
Las colectas se realizaron en nueve localidades de Venezuela, las cuales se presentan en la tabla a continuación.

**Tabla 1.** Localidades muestreadas para la colecta de larvas de *Culex quinquefasciatus* y su información geoespacial.

Localidades	Estado	Coordenadas	Altitud	Temperatura media anual.°C
1.- Cementerio de la Colonia Tovar (CCT)	Aragua	10° 24' 30,0''N 67° 17' 18,9''O	1.834m	16.8
2.-Cementerio General del Sur (CGS)	Distrito Capital	10°28'46,4''N 66°55'09,2''O	900m	20.8
3.-Cementerio del Hatillo (CH)	Miranda	10°35'26,11''N 66°49'45'' O	1.490m	18-26
4.-Cementerio Punta Mulatos (CPM)	Vargas	10°36'15,8''N 66°55'9,2''O	4m	28
5.- Cementerio Municipal San Juan de los Morros (CG)	Guárico	09°54'36,75''N 67° 21' 10,42''O	512m	24-28
6.- Cementerio Municipal Chichiriviche (CF)	Falcón	10°55'52,73''N 68°16'17,83''O	15m	28.4
7.- Cementerio Municipal Mariño (CM)	Aragua	10°14'37,85''N 67°36'16,08''O	450m.	16.8
8.- Cementerio Municipal de San Félix (CB)	Bolívar	08°19'53,09'' N 62°39'02,18'' O	120m	27°-30°
9.-Cloaca (Parque del Este) (PE)	Distrito Capital	10°29'25,1''N 66°50'18,5'' O	857m	20.8

Las poblaciones 1-4 y 9 utilizadas provinieron de colectas obtenidas directamente en campo, las poblaciones 5,6,7,8 fueron proporcionadas por el Instituto de Altos Estudios en Salud Pública y Postgrado de Entomología Fagro, UCV Maracay por convenio de Investigación entre las partes.

Por otra parte, se colectaron larvas y adultos *Culex corniger* (del Cementerio General del Sur), junto con *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Parque del Este) para ser utilizados como grupo externo en los posteriores análisis.



**Figura 6.** Mapa del área de estudio (Venezuela). Cada punto representa las localidades donde se hizo la colecta de *Culex quinquefasciatus*, *Culex corniger*, *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

### Colecta:

Las colectas fueron realizadas en varios cementerios del país, los cuales representan la unidad de muestreo equivalentes a localidades geográficas. Dentro de cada cementerio visitado se escogieron floreros de forma aleatoria considerando los diferentes microhábitats (ejem: sombra, sol) y tratando de abarcar el área total del cementerio. Los floreros representan, para la especie, uno de los criaderos más importantes en su distribución mundial, así como los cementerios, usados como localidades de estudio. Estos (floreros) poseen la característica esencial de retener agua, acumular materia orgánica producto de la descomposición floral y encontrarse en gran número dentro de la unidad muestral. (Barrera R, 1977). Como ejemplares de comparación del grupo de estudio (individuos criados en floreros) se incluyeron algunos

ejemplares de otro tipo de criaderos (desagües) provenientes de la localidad Parque del Este.

El contenido de los floreros se vertió en una bandeja plástica para verificar la presencia de larvas y pupas de mosquitos. Después de dicha verificación se colocó el contenido de los floreros en una bolsa Whirl-Pack de cierre hermético y se trasladó al Laboratorio de Biología de Vectores, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela (LBV, *sensu* Guimaraes, 1997) para su cría asociada hasta la fase adulta (Belkin *y col.*, 1966).

### **Procedimiento de laboratorio:**

#### **Cría, identificación y preservación de los organismos.**

Una vez en el laboratorio se procedió a la cría de las larvas y/o pupas, siendo éstas separadas en viales individuales hasta obtener el adulto el cual fue identificado mediante el uso de claves morfológicas tradicionales (Cova García *y col.*, 1966; Lane, 1953). Y a dichos individuos adultos, se procedió a extraerle las tres patas del lado derecho las cuales se preservaron en alcohol 99% para los análisis moleculares.

Se preservaron las exuvias de las larvas, de las pupas y el resto del adulto para comprobaciones morfológicas, como “voucher” de acuerdo al protocolo descrito en Navarro y Weaver (2004). Codificándolos de manera de asociarlos a la amplificación del ADN, dicho código lleva la información referente a la colecta.

Los datos obtenidos de la amplificación fueron almacenados en la base de datos de ADN y los que fueron preservados en la base de datos de la colección de Culicidae del



LBV-IZT-UCV (LBV *sensu* Guimaraes, 1997). Todo esto se realizó siguiendo los procedimientos descritos en Belkin y *col.*, (1965) y Navarro y *col.*, (2007), para la colecta, almacenamiento, procedimiento de identificación y cría de organismos.

### **Extracción de ADN.**

Se utilizó un total de 150 individuos de *Cx. quinquefasciatus*, 2 individuos de *Aedes aegypti*, 2 de *Aedes albopictus* y 4 individuos de *Cx. corniger*, tanto para el gen COI como para ND5. La extracción individual del ADN de las patas de éstos, se siguió el protocolo de Bender y *col.*, (1983) modificado por Arrivillaga y *col.*, (2002) que se describe a continuación:

- Se realizó un paso de rehidratación con solución amortiguadora durante un período de 12-24 horas a 4°C en 100ul de solución amortiguadora con 0.08M NaCl, sacarosa 0.16M al 0.5%, Tris-Cl 0.1M a pH 8.6, previo a la homogenización de la muestra.
- Las tres patas ya hidratadas se homogenizaron en un tubo Eppendorf plástico de 1.5ml con 50 ul de solución amortiguadora empleando una micromortero a baterías (Kontes, Vineland, NJ).
- Este homogenato fue incubado a 65°C por 30 minutos y se le adicionó 7 ul de acetato de potasio 8M para obtener una concentración final de 1M. Esta mezcla se incubó por 30 minutos a 4°C y se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 minutos a 14000 rpm.
- El sobrenadante fue removido a un tubo fresco y limpio, al cual se le adicionó 100 ul de etanol 99% (frío) y nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones.

- Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol con etanol al 70%, se centrifugó durante 10 minutos a 14000 rpm y se extrajo el sobrenadante.
- Por último, se volvió a precipitar con etanol al 99% (frío) y se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm, luego se extrajo el sobrenadante, y se procedió finalmente al secado y resuspensión de la muestra en 50 ul de agua molecular.
- Las extracciones de cada una de las muestras fueron almacenadas a 20°C y utilizadas para la amplificación.

### **Amplificación de ADN por PCR.**

Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polimerase Chain Reaction) fueron las siguientes:

Para la reacción de amplificación de ADN mitocondrial (región COI) el cocktail y condiciones empleadas son las mostradas en la **Tabla 2**, ajustadas al protocolo de Kambhampati y Smith (1995).

**Tabla 2.** Protocolo y condiciones para la reacción de amplificación del ADN mitocondrial (**Región COI**).

<b>Cocktail</b>	<b>Volumen ul</b>	<b>Condiciones de PCR</b>
H2O molecular	10.3	Un ciclo 95°C por 3 minutos
Buffer de reacción	5	35ciclos a 95° C por 30segundos
MgCl2 (25mM)	4	45°C por un minuto
Primer (+)	1	72°C por un minuto
Primer (-)	0.9	Extensión final a 72°C por 7 minutos.
DNTP' s (10mM)	<b>0.5</b>	
Taq ADN polimerasa	0.3	
ADN templado	3	
Volumen final:	25	

Para la reacción de amplificación de la región ND5 el cocktail y condiciones empleadas son las mostradas en la **Tabla 3**, ajustadas al protocolo de Krzywinski y *col.* (2003).

**Tabla 3.** Protocolo y condiciones para la reacción de amplificación del ADN mitocondrial (**Región ND5**).

Cocktail	Volumen ul	Condiciones de PCR
H2O molecular	10,5	Un ciclo 95°C por 5 minutos
Buffer de reacción	5	35 ciclos a 94° C por 30 segundos
MgCl2 (25mM)	4	50°C por un minuto
Primer (+)	0.75	72°C por 30 segundos
Primer (-)	0.75	Extensión final a 72°C por 10 minutos.
DNTP's (10mM)	0.5	
Taq ADN polimerasa	0.5	
ADN templado	3	
Volumen final:	25	

Los primers o cebadores para la amplificación del ADN mitocondrial por PCR fueron:

**Para Gen COI:**

- **C1J1632** (Lectura directa – Forward): 5'- TGATCAAATTTATAAT -3' para la amplificación 5' – 3' del gen COI primer diseñado por Kambhampati y Smith (1995).
- **C1N2191** (Lectura reversa- Reverse):  
5'- GGTAAAATTAAAATATAAACTTC- 3' para la amplificación 3' – 5' del complementario del gen COI. Este primer fue diseñado por Simon y *col.* (1994) y modificado por Kambhampati y Smith (1995).

Se amplificó una región de aproximadamente 556pb dentro de la porción del gen COI entre las posiciones 1632 y 2191 (específicamente 2188 por la modificación realizada por Kambhampati y Smith (1995).

**Para Gen ND5:**

- **ND5 +** (Lectura directa- Forward): 5'- TCCTTAGAATAAAAATCCCCGC- 3' para la amplificación 5' – 3' del gen ND5.
- **ND5 -** (Lectura reversa- Reverse): 5'- GTTTCTGCTTTAGTTCATTCTCT-3' para la amplificación 3' – 5' del complementario del gen ND5.

Ambos primers fueron diseñados por Birungi y Mustermann (2002) y se amplificó una región de aproximadamente de 450pb dentro de la porción del gen ND5.

Los productos de amplificación (ADNmt) para la regiones mitocondriales COI y ND5 fueron analizados por medio de electroforesis sobre geles de agarosa al 1% en solución Tampón TBE (Sigma, Tris Borato 0.445 M; EDTA 0.01 M, pH 8.3; 5X concentrado) al 10% teñidos con Bromuro de Etidio y utilizando 3ul de muestra (producto de PCR). Las corridas se realizaron durante un período de 1 hora usando una corriente de 70voltios. Las bandas obtenidas fueron visualizadas en una cámara de luz ultravioleta y fotografiadas con una cámara digital.

Se realizó la purificación de los productos de PCR siguiendo el protocolo que sugiere el Kit de purificación de ADN – Wizard Genomic (Promega), para remover el exceso de primer, nucleótidos y polimerasa, y finalmente se envió a secuenciar al CeSAAN-IVIC (Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucleicos).

### **Análisis de secuencias de COI y ND5.**

Las secuencias obtenidas fueron revisadas mediante los cromatogramas producidos en el secuenciador (ABI Prism Cessan-IVIC) mediante el software Sequencher 4.1 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) con el cual se corrigieron ambigüedades (N) y errores de secuenciación mediante el “Contig” producido entre las secuencias directa y reversa.

Las secuencias consenso se analizaron mediante un programa de alineamiento local: MacVector versión 7.2 (Accelrys, Madison, WI) y se realizaron búsquedas en Gen Bank NCBI (Blast) para verificación de la validez de las secuencias mediante su identidad con secuencias de la misma especie o especies cercanas y/o del mismo género dependiendo de la existencia de secuencias en Gen Bank. Con las secuencias obtenidas (consenso y validadas) se realizaron alineamientos múltiples por el método o algoritmo de Thompson y *col.* 1998 empleando el programa Clustal W [en MacVector versión 7.2; Accelrys, Madison, WI]. Se produjeron matrices en formato NEXUS para los análisis posteriores.

Se hicieron 2 alineamientos con las secuencias obtenidas para cada gen (COI y ND5), el primer alineamiento constituido sólo por secuencias de *Cx. quinquefasciatus* de las 9 localidades estudiadas. El segundo alineamiento considera sólo los haplotipos diferentes en las muestras de *Cx. quinquefasciatus*, incluyendo el grupo externo o de referencia, representando por secuencias de *Cx. corniger*, y muestras de *Aedes aegypti* y de *Ae. albopictus*). Un tercer alineamiento fue hecho incluyendo secuencias de *Cx. quinquefasciatus* y los grupos de referencia pero combinando en una misma matriz los dos genes utilizados.

Las secuencias alineadas fueron introducidas en un archivo GCG (msf) en MacClade para la edición de la matriz de secuencias. Una vez corregida la matriz, corrigiendo problemas locales mínimos, ésta fue exportada en los formatos (NEXUS, PHYLIP Y MEGA) adecuados para trabajar en los programas requeridos para la realización del resto de los análisis.

Haciendo uso del programa DNAsp (Rozas y Rozas, 1999) se determinaron los haplotipos totales, es decir los haplotipos presentes en todas las localidades muestreadas y de esta manera observar las variaciones entre las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* y los haplotipos dentro de cada localidad es decir, dentro de cada cementerio estudiado de tal manera de observar la variación intrapoblacional.

Con este mismo programa (DNAsp) se calcularon los siguientes estadísticos *dentro* y *entre* las poblaciones: Diversidad nucleotídica estimada por Nei (1987), estimación de diferenciación genética entre haplotipos de poblaciones de diferentes localidades calculada por el estadístico Hst (Hudson y col., 1992), Tajima Test “D” para neutralidad utilizando el número total de sitios segregantes.

A partir de las secuencias ya alineadas de los haplotipos diferentes obtenidos de las distintas localidades se realizaron análisis filogeográficos bajo el criterio de máxima parsimonia como método de optimización y búsqueda heurística, haciendo uso de PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) para obtener el (los) cladograma (s) más parsimonioso(s) mediante construcción de árboles de Wagner con 1000 replicas de adición al azar y con recorte y reconexión de ramas (TBR) en búsqueda de islas de árboles. Todos los caracteres fueron tratados con igual peso, multiestado y en forma

desordenada (no aditivos). Los gaps fueron tratados como datos perdidos para los análisis. Se realizaron consensos estrictos para sintetizar las soluciones obtenidas.

Adicionalmente se hizo un repesado de caracteres mediante el índice de consistencia recalculado en búsqueda de soluciones más óptimas. Se evaluó el apoyo de grupos con un re-muestreo de la matriz vía Bootstrapping (Felsenstein, 1985) evaluando así la robustez de los grupos o clados. Se hizo el cálculo de las matrices de distancia pareadas sin corrección y por Kimura dos parámetros (K2P) (Kimura, 1980) mediante PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002).

El cálculo de Minimum Spanning Network (“red de mínima expansión”) (Clement y *col.* 2000) se realizó para obtener una discriminación fina de los patrones biológicos por medio del análisis de patrones espaciales/temporales de variación genética (Templeton, 1998), utilizando el programa TCS, debido a la ausencia de estructuración filogenética y formación de clados monofiléticos apoyados.

Se realizó la prueba de homogeneidad entre hipótesis (Partition Homogeneity Test) por búsqueda heurística y TBR en Paup 4.0b10 para determinar la concordancia de los datos (COI+ND5) para realizar los análisis de matrices combinadas (Farris y *col.*, 1995).

## RESULTADOS GENERALES

Fueron secuenciadas un total de 158 amplicones de los fragmentos de 556pb de ADNmt COI y 450pb de ADNmt ND5, de las cuales se utilizaron 76 secuencias de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de las diferentes localidades, para el gen COI y 68 para ND5 (18 amplicones adicionales se secuenciaron para los grupos de referencia). La razón de esto se debe a que la secuenciación de los amplicones no fue eficiente en un 100% para ambos genes, por tanto para tener un número de secuencias representativo por cada gen y que a su vez éstas fueran confiables se tomaron las mejores secuencias correspondiente a cada gen, por lo que 44 secuencias son comunes a ambos genes que fueron utilizadas para la prueba de homogeneidad y los análisis de la matriz combinada.

El número de muestras de *Cx. quinquefasciatus* utilizadas por cada localidad se muestra en la **Tabla 4**, así mismo 2 muestras de *Aedes aegypti*, 2 muestras de *Aedes albopictus* y 4 muestras de *Culex corniger*. Adicionalmente se utilizaron 2 secuencias de *Cx. corniger* de GenBank sólo para los análisis correspondientes al gen COI ya que no se encontraron secuencias disponibles para ND5.

**Tabla 4.** Número de muestras de *Culex quinquefasciatus* utilizadas para cada localidad de estudio.

Localidad	Número de muestras (Individuos) gen COI	Número de muestras (Individuos) gen ND5
1.- Cementerio de la Colonia Tovar (CCCT)	6	9
2.-Cementerio General del Sur (CCGS)	9	9
3.-Cementerio del Hatillo (CCH)	6	9
4.-Cementerio Punta Mulatos (CCPM)	18	10
5.- Cementerio Municipal San Juan de los Morros (CCG)	10	8
6.- Cementerio Municipal Chichiriviche (CVF)	9	7
7.- Cementerio Municipal Mariño (CCM)	7	9
8.- Cementerio Municipal de San Félix (CCB)	8	8
9.-Cloaca (Parque Generalísimo Francisco de Miranda) (CPE)	3	2

Para cada gen (COI y ND5) se realizaron dos alineamientos, el primer alineamiento constituido sólo por secuencias de *Cx. quinquefasciatus* de las 9 localidades estudiadas,



el cual fue utilizado para calcular el número de sitios variables (Polimorfismo), diversidad nucleotídica, diversidad y número de haplotipos presentes en las secuencias del total de las poblaciones, como para cada población. Este alineamiento incluye un total de 542 caracteres (pares de bases) por 76 taxa que corresponden al número de secuencias para el gen COI y 425 caracteres por 68 taxa para el gen ND5. Este alineamiento fue utilizado para el cálculo del Minimum spanning network para los dos genes.

En el segundo alineamiento se consideraron sólo los haplotipos diferentes en las secuencias de *Cx. quinquefasciatus*, incluyendo un total de 542 caracteres (pares de bases) por 53 taxa para el gen COI y 425 caracteres por 51 taxa para ND5, los cuales se utilizaron en los análisis de parsimonia. De las 53 secuencias utilizadas en los análisis con el gen COI, 43 corresponden a *Cx. quinquefasciatus* (ingroup) y 10 muestras, 6 secuencias de *Cx. corniger* y 4 secuencias de un género diferente (2 de *Ae. aegypti* y 2 de *Ae. albopictus*) representando grupo hermano y grupo externo (outgroup) respectivamente. Para el gen ND5, de los 50 taxa utilizados, 42 corresponde a *Cx. quinquefasciatus*, 4 de *Cx. corniger*, 2 de *Ae. aegypti* y 2 de *Ae. albopictus*.

Un tercer alineamiento (con las secuencias/individuos comunes a ambos fragmentos) se realizó para la prueba de homogeneidad, incluyendo un total de 44 taxa por 966 caracteres. De los 44 taxa, 35 corresponden a *Cx. quinquefasciatus* y 9 muestras (5 muestras de *Cx. corniger*, y 4 muestras de *Aedes aegypti* y *albopictus*) fueron utilizadas como grupos referencia para enraizar el árbol.

A continuación se muestran los resultados específicos para cada gen (COI y ND5) con las poblaciones estudiadas

## GEN COI:

### Longitud de las secuencias y Contenido Guanina + Citosina (%G+C).

Las secuencias del ingroup presentaron una longitud de 542pb. Por otra parte, las secuencias referencia, presentaron una longitud entre 595-602pb en el caso de los *Aedes*, y un valor de longitud de 478pb y 555pb en el caso de *Cx. corniger* provenientes de Gen Bank y las amplificadas en este trabajo respectivamente.

El contenido de G+C (Tabla 5) en las secuencias obtenidas estuvo comprendido en un intervalo de 31,3% en las muestras de los cementerio de la Colonia Tovar y de Guárico hasta un 31,8% para las muestras del cementerio Municipal Mariño, similar al porcentaje señalado para otras especies de mosquitos (*Anopheles* 31,4%, *Drosophila* 30,2% (Herbeck y November, 2003), especies de la Sección Melanoconion y de la Sección Spissipes del subgénero *Melanoconion* con 30,57 – 35,15% (Hernández, 2005) y 31,9% en especies del subgénero *Nyssorhynchus* de *Anopheles* (Navarro y col. 2009)).

**Tabla 5.** Porcentaje de Guanina + Citosina del fragmento de ADNmt (COI) amplificado (en pares de bases) de *Cx. quinquefasciatus* perteneciente a cada localidad de estudio.

Localidad	% G+C
1.- Cementerio de la Colonia Tovar (CCCT)	31,3
2.-Cementerio General del Sur (CCGS)	31,4
3.-Cementerio del Hatillo (CCH)	31,3
4.-Cementerio Punta Mulatos (CCPM)	31,5
5.- Cementerio Municipal San Juan de los Morros (CCG)	31,3
6.- Cementerio Municipal Chichiriviche (CVF)	31,4
7.- Cementerio Municipal Mariño (CCM)	31,8
8.- Cementerio Municipal de San Félix (CCB)	31,5
9.-Cloaca (Parque del Este) (CPE)	31,4

### **Sitios variables o polimorfismo.**

El alineamiento de 76 secuencias (total de todos los cementerios) de *Cx. quinquefasciatus* encontrado para el gen COI, muestra que 15,31% de los sitios fueron polimórficos y 13,28% filogenéticamente informativos. Los porcentajes de sitios polimórficos pertenecientes a cada población se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Porcentaje de sitios polimórficos del gen **COI**, correspondientes a las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de las diferentes localidades estudiadas.

<b>Pob.</b>	<b>Nº de individuos</b>	<b>Sitios variables</b>	<b>% de sitios polimórficos</b>
<b>CCT</b>	6	8	1,47
<b>CGS</b>	9	4	0,73
<b>CH</b>	6	23	4,24
<b>CPM</b>	18	25	4,61
<b>CG</b>	10	14	2,58
<b>CF</b>	8	8	1,47
<b>CM</b>	7	4	0,73
<b>CB</b>	8	9	1,66
<b>PE</b>	3	2	0,92
<b>TOTAL</b>	76	83	15,31

Leyenda: Cementerio de la Colonia Tovar (CCT); Cementerio General del Sur (CGS); Cementerio del Hatillo (CH); Cementerio Punta Mulatos (CPM); Cementerio Municipal San Juan de los Morros (CG); Cementerio Municipal Chichiriviche (CF); Cementerio Municipal Mariño (CM); Cementerio Municipal de San Félix (CB); Cloaca (Parque del Este) (PE).

### **Haplotipos obtenidos.**

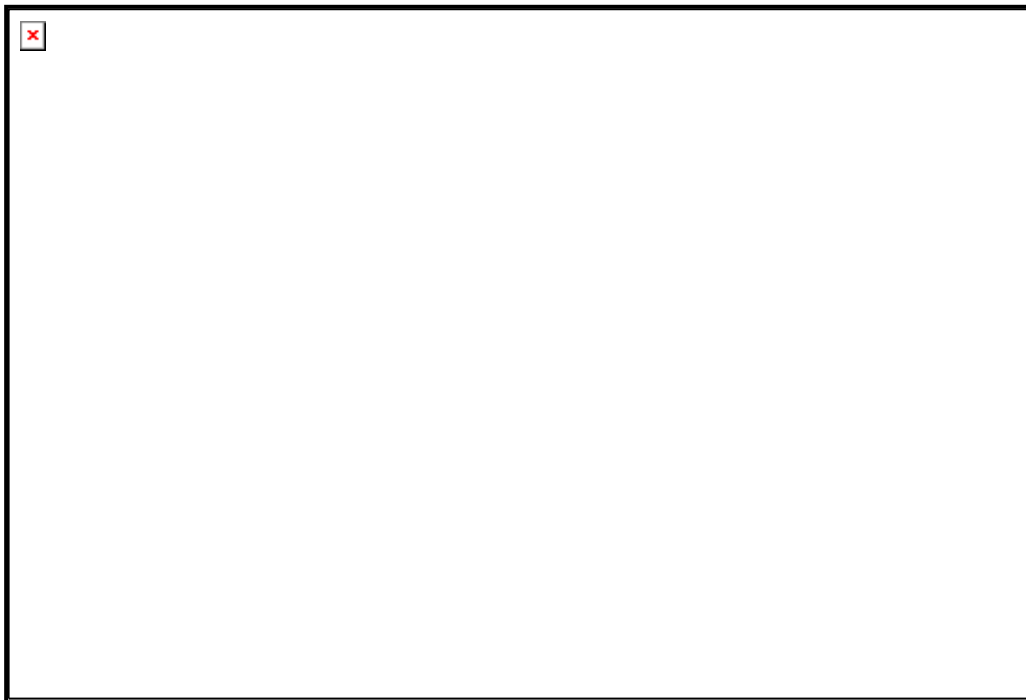
La porción amplificada del gen COI mostró 83 sitios variables definiendo 31 haplotipos (**Tabla 7**) en un total de 76 muestras de *Cx. quinquefasciatus* de los cementerios muestreados.

**Tabla 7.** Frecuencia de haplotipos para el gen **COI**, encontrados en un total de 76 individuos de *Cx. quinquefasciatus* pertenecientes a los diferentes cementerios de las localidades estudiadas.

Hap	Poblaciones	N° de Individuos	Códigos de las muestras	Frecuencia
H1	Parque del Este Cementerio de la Colonia Tovar Cementerio General del Sur Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal de San de los Morros Cementerio del Hatillo	18	CqPE2 Cq-PE9 Cq-CCCT44 Cq-CCPM07 Cq-CCPM23 Cq-CCPM24 Cq-CCPM08 Cq-CCPM37 Cq-CCPM26 Cq-CCPM03 Cq-CCPM09 Cq-CCH61 Cq-CCH62 Cq-CCGS02 Cq-CCGS06 Cq-CCG02 Cq-CCG13 Cq-CCG09	0,58
H2	Parque del Este Cementerio General del Sur, Cementerio Municipal de Chichiriviche Cementerio Municipal San Félix	17	Cq-CPE_8 Cq-CCGS01 Cq-CCGS10 Cq-CCGS04 Cq-CCGS07 Cq-CCF11 Cq-CCF15 Cq-CCF13 Cq-CCF19 Cq-CCF18 Cq-CCB01 Cq-CCB03 Cq-CCB04 Cq-CCB06 Cq-CCB14 Cq-CCB12 Cq-CCB13	0,54
H3	Cementerio de la Colonia Tovar	3	Cq-CCCT32 Cq-CCCT42 Cq-CCCT37	0,09
H4	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCCT41	0,03
H5	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCCT46	0,03
H6	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CCPM1	0,03
H7	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CCPM31	0,03
H8	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CCPM38	0,03
H9	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CCPM34	0,03
H10	Cementerio Punta Mulatos	2	Cq-CCPM20 Cq-CCPM30	0,06
H11	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CCPM36	0,03
H12	Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal Mariño Cementerio General del Sur Cementerio Municipal de San de los Morros	7	Cq-CCPM13 Cq-CCM07 Cq-CCM04 Cq-CCM06 Cq-CCM02 Cq-CCGS03 Cq-CCG14	0,22
H13	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CCPM29	0,03
H14	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CCPM05	0,03
H15	Cementerio Municipal Mariño	3	Cq-CCM13 Cq-CCM14 Cq-CCM01	0,09
H16	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CCH45	0,03
H17	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CCH44	0,03
H18	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CCH43	0,03
H19	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CCH34	0,03
H20	Cementerio General del Sur	1	Cq-CCGS08	0,03
H21	Cementerio General del Sur	1	Cq-CCGS05	0,03
H22	Cementerio Municipal de San de los Morros	1	Cq-CCG11	0,03
H23	Cementerio Municipal de San de los Morros	1	Cq-CCG06	0,03
H24	Cementerio Municipal de San de los Morros	1	Cq-CCG10	0,03
H25	Cementerio Municipal de San de los Morros	1	Cq-CCG03	0,03
H26	Cementerio Municipal de San de los	1	Cq-CCG07	0,03
H27	Cementerio Municipal de San de los	1	Cq-CCG04	0,03
H28	Cementerio Municipal de Chichiriviche,	1	Cq-CCF04	0,03
H29	Cementerio Municipal de Chichiriviche	2	Cq-CCF14 Cq-CCF12	0,06
H30	Cementerio Municipal de Chichiriviche	1	Cq-CCF20	0,03
H31	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CCB02	0,03

El Minimum Spanning Network (**Figura 7**) generado por TCS, ilustra las relaciones de los 31 haplotipos encontrados. Distinguiéndose 3 grupos principales: un grupo estuvo caracterizado por las poblaciones de los cementerios de Colonia Tovar, Punta Mulato, Hatillo, General del Sur, Municipal de San de los Morros y una población del Parque del Este (haplotipo 1); el segundo grupo, representado por el

haplotipo 2, comprende las poblaciones del cementerio Municipal de Chichiriviche y Bolívar, así como el cementerio General del Sur y el Parque del Este al igual que el haplotipo 1; y el tercer grupo, representado por el haplotipo 12, presentes en las poblaciones del cementerio Municipal Mariño y en los cementerios de Punta Mulato, General del Sur, Municipal de San de los Morros. (**Tabla 7**).



**Figura 7.** Minimum Spanning Network entre los haplotipos obtenidos con el gen mitocondrial COI. Cada punto indica sustituciones de nucleótidos. El número dentro de cada compartimiento corresponde al número del haplotipo. El tamaño de cada compartimiento es proporcional a la frecuencia de haplotipos encontrados. (Ver **Tabla 7**).

El haplotipo más común encontrado fue H1 con una frecuencia de 0,58 presente en 18 individuos, en muestras de 6 localidades estudiadas. Las poblaciones de todos los cementerios mostraron haplotipos únicos excepto las muestras del Parque del Este. El tamaño de muestra por sitios, distribución y frecuencia del resto de los haplotipos se muestran en la **Tabla 7**.

## **Diferenciación poblacional:**

### **Diversidad de haplotipos y Diversidad nucleotídica.**

La diversidad de haplotipos global para el total de las poblaciones de los diferentes cementerios (sin incluir al grupo externo) fue  $H_t$ : 0,8884. Dentro de cada población la diversidad de haplotipos obtenidas se muestran en la **Tabla 8**. La diversidad nucleotídica en el total de las muestras fue  $\Pi$  (t): 0,01161.

### **Valores de $H_{ST}$ .**

Los valores de  $H_{ST}$  correspondientes a las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de cada cementerio no fueron estadísticamente significativos (**Tabla 8**), indicando que no existen diferencias significativas entre las poblaciones de cada localidad muestreada.

### **Valor de Tajima's D.**

Para el total de las muestras se obtiene un valor de Tajima negativo D (-2,11291), el cual fue estadísticamente significativo  $P < 0.05$ ; sin embargo los valores de Tajima para cada población fueron muy variables (**Tabla 8**), mostrando valores negativos y no significativos estadísticamente para las poblaciones de cinco localidades (Cementerio del Hatillo, Municipal Chichiriviche, Municipal San Félix, Municipal San Juan de los Morros, Punta Mulatos), y valores positivos para las poblaciones de tres localidades (Cementerio General del Sur, Colonia Tovar y Municipal de Mariño) siendo estadísticamente significativo para la población del cementerio Municipal Mariño 2,12595 \* $P < 0.05$ .

**Tabla 8.** Números de haplotipos para el gen **COI** y valores de diversidad de haplotipos, diversidad nucleotídica, estadístico de Hudson (Hst) y prueba de Tajima's D correspondiente a las poblaciones de cada localidad estudiada.

Pob.	Nº de Haplotipos	Diversidad de haplotipos de subpoblación (Hs)	Estadístico de Hudson (Hst)	Tajima's D
CCT	4	0,800	0,100 P: 0,1366	1,73257 P > 0.10
CGS	5	0,806	0,242 P: 0,6225	0,07803 P > 0.10
CH	5	0,933	0,005 P: 0,9429	-1,23802 P > 0.10
CPM	10	0,810	0,098 P: 0,7545	-0,70146 P > 0.10
CG	8	0,933	0,037 P: 0,8473	-1,55676 P > 0.10
CF	4	0,694	0,960 P: 0,3273	-0,34120 P > 0.10
CM	2	0,571	0,358 P: 0,1306	2,12595 P < 0.05*
CB	2	0,850	0,15 P: 0,1435	-1,05482 P > 0.10
PE	2	0,667	0,039 P: 0,8905	No aplica
Haplotipos Totales	31			
Diversidad de haplotipos total (H <sub>T</sub> )	0,8884			

\*Significativo

### Distancias Genéticas.

Las distancias genéticas, indicaron valores K2P intra-especie entre 0,1-2,8% (Apéndice 1) para *Cx. quinquefasciatus*, de 0,55-3% para *Cx. corniger*, de 0% para *Aedes aegypti* y 0,9% para *Aedes albopictus*. Estos valores de distancias genéticas observados están muy cercanos a los valores intraespecie reportados por (Hernández, 2005, Navarro, 2000) para otras especies del género *Culex* (0-2%), y por (Navarro y col. 2009) para otras especies de dípteros como lo son las especies pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus* en *Anopheles* (0,3- 1,68%).

Especies del mismo género mostraron distancias entre 12,44- 12,89%, tal es el caso de *quinquefasciatus* y *corniger*, mientras que entre las especies *aegypti* y *albopictus* del género *Aedes* los valores de distancias estuvieron entre 14,06-14,07%; valores mucho más altos a los reportados por (Hernández, 2005; Navarro y col., 2009), que fueron de 4-7% y 7,4-7,9% respectivamente.

Sugiriendo estos resultados que el fragmento del gen COI estudiado fue más sensible en la definición de una filogenia concordante con la clasificación actual.

### **Análisis filogenéticos.**

Un total de 53 secuencias provenientes de 4 especies y 542 nucleótidos como caracteres fueron alineadas y usadas en el análisis. Del total de caracteres, 368 fueron constantes, 45 no informativos y 129 informativos para parsimonia. Los análisis con los caracteres tratados con igual peso (**Figura 8**) y con caracteres repesados realizados con 1000 replicas, arrojaron los siguientes resultados de estadística descriptiva (**Tabla 9**):

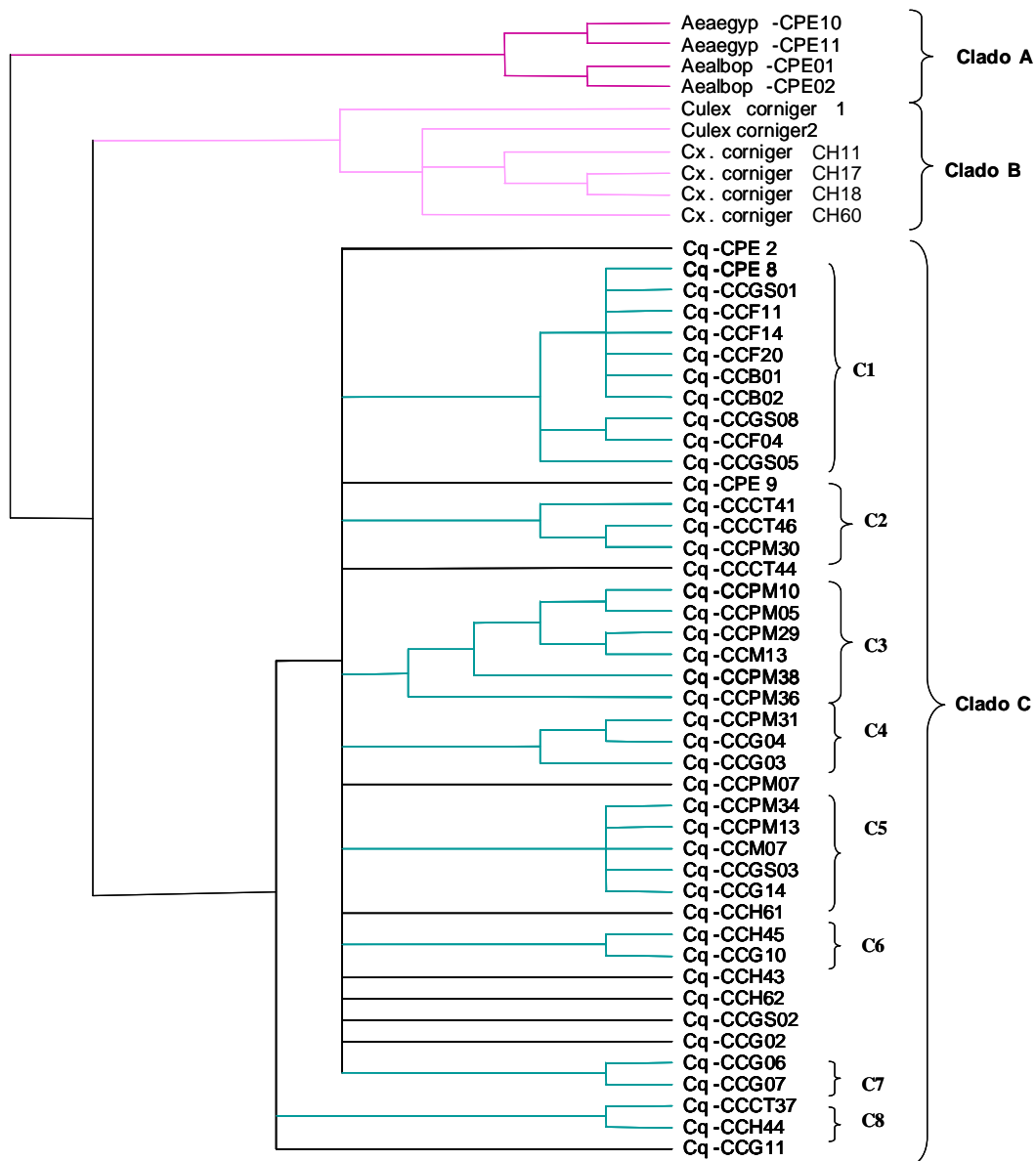
**Tabla 9.** Número de soluciones, longitudes de los árboles (L), los índices de consistencias (IC), los índices de retención (IR) y los índices de homoplasias (IH), obtenidos en los análisis de parsimonia.

Gen COI	Soluciones	Longitud (L)	Índice de consistencia (IC)	Índice de retención (IR)	Índice de homoplasias (IH)
Árboles parsimoniosos, caracteres con igual peso.	2808	263	0,783	0,889	0,217
Árboles parsimoniosos, caracteres repesados	49	209	0,860	0,930	0,140

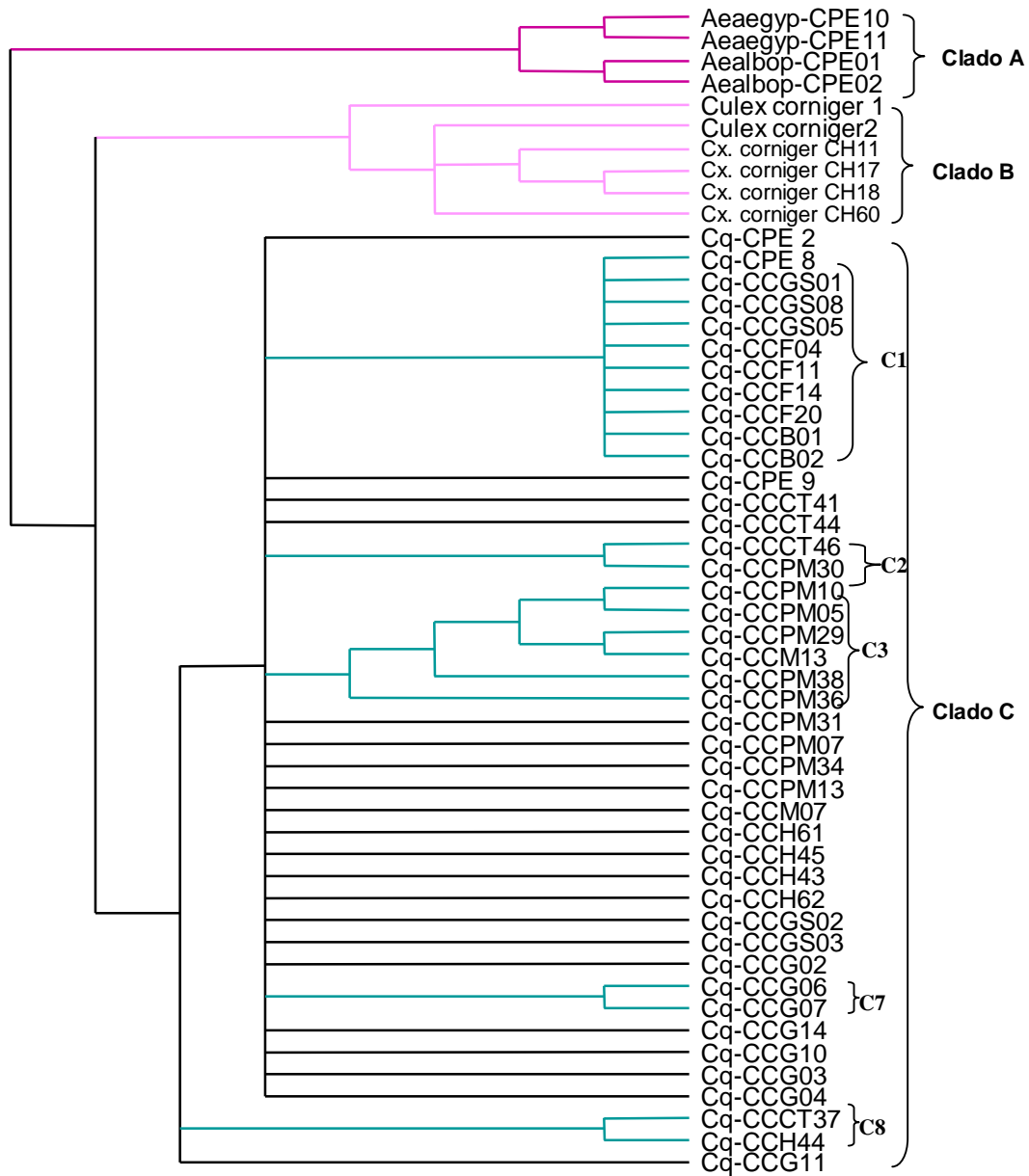
Las topologías en cada análisis (pesos iguales y repesados) no muestran diferencias en la agrupación interna del ingroup en estudio. El análisis con repesado de caracteres mostró 49 soluciones con topologías iguales a las obtenidas con los caracteres tratados con igual peso.

En una de las soluciones parsimoniosa (caracteres pesados) mostrada en los resultados, así como el árbol consenso, se pueden observar 3 clados principales monofiléticos y con apoyo de remuestreo (**Figura 8 y Figura 9**).





**Figura 8.** Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de 49 soluciones obtenidas para el gen **COI** mediante el análisis heurístico + TBR de 53 taxa (31 haplotipos) por 542 caracteres (pb), caracteres pesado y gaps tratados como datos perdidos. Se incluyen las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de cada cementerio de las diferentes localidades y los grupos de referencia. Se incluye dos especies de *Aedes aegypti* y *albopictus* como grupos externos y *Cx corniger* como grupo hermano.



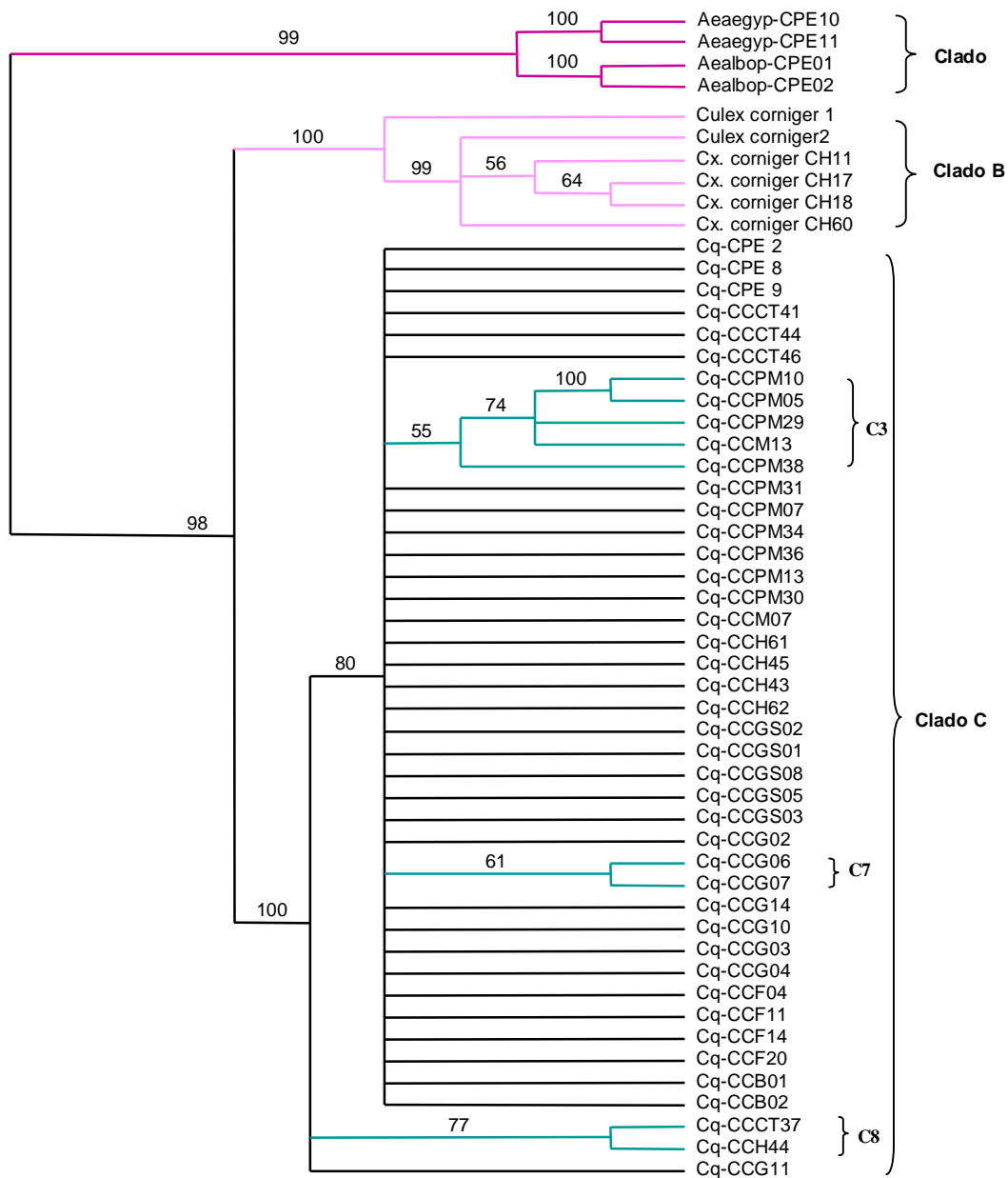
**Figura 9.** Consenso estricto de los 49 árboles obtenidos por la búsqueda heurística para el gen **COI**.

El **Clado A** representado por el Género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*), el **Clado B** representado por secuencias de *Culex corniger* y el **Clado C**, representado por secuencias de *Cx quinquefasciatus* (de todos los cementerios estudiados y PE).

En el **Clado C**, de la búsqueda heurística se observan ocho subclados **C1** (CPE8- CCGS05), **C2** (CCCT41- CCPM30), **C3** (CCPM10- CCPM36), **C4** (CCPM31- CCG03), **C5** (CCPM34- CCG14), **C6** (CCH45- CCG10), **C7** (CCG06- CCG07) Y **C8** (CCCT37- CCH44), de los cuales solo cinco se mantienen en el consenso estricto (clados que están en absolutamente todas las soluciones), los cuales fueron: C1 con muestras de Parque del Este, Cementerio Municipal san Félix, Chichiriviche, General del Sur, C2 con muestras del cementerio de la Colonia Tovar y Punta Mulatos, C3 con muestras del cementerio de Punta Mulato y Municipal Mariño, C7 con secuencias de los cementerios Municipal de San Juan de los Morros y C8 con secuencias del cementerio de la Colonia Tovar y del Hatillo.

En todas las topologías obtenidas y en el consenso, las secuencias correspondientes a los grupos hermanos y externos (**Clado A** y **Clado B**) se ubicaron externamente y monofiléticos con respecto al grupo interno (**Clado C**).

En el análisis de re-muestreo o bootstrapping realizado con 500 replicas (**Figura 10**) se observa el apoyo de grupos, muestra a las secuencias pertenecientes al **Clado A** como grupo basal con un 99% de apoyo, internamente se deriva el **Clado B** y **Clado C** con un apoyo de 100% para ambos clados y diferenciados entre sí con un valor de apoyo de 98%. El clado *quinquefasciatus* se muestra como una politomia (clados no resueltos internamente), mostrando algunos subclados con bajo apoyo como C3 con 55% y C6 con 61% con la excepción del subclado C7 y la secuencia CCG11 con un apoyo de 77%. El resto de los subclados definidos en la búsqueda heurística fueron colapsados al realizar el bootstrapping.



**Figura 10.** Árbol resultante del remuestreo o análisis de Bootstrapping para el gen COI en 53 taxa (31 haplotipos) de *Culex quinquefasciatus*.

## **GEN ND5:**

### **Longitud de las secuencias y Contenido Guanina + Citosina (%G+C):**

Las secuencias presentaron una longitud 425pb. Los valores de longitud de las secuencias a utilizar como grupo externo fue de 453pb para los *Aedes* y 453-460pb para los *Cx. corniger*.

El porcentaje de G+C (**Tabla 10**) de las secuencias obtenidas estuvo comprendido en un intervalo de 23,9 % en las muestras del cementerio de la Colonia Tovar, hasta 24,5% en las muestras del Parque del Este.

**Tabla 10.** Porcentaje de Guanina + Citosina del fragmento de ADNmt (**ND5**) amplificado (en pares de bases) de *Cx. quinquefasciatus* perteneciente a cada localidad de estudio.

Localidad	% G+C
1.- Cementerio de la Colonia Tovar (CCCT)	23,9
2.-Cementerio General del Sur (CCGS)	24,3
3.-Cementerio del Hatillo (CCH)	24,2
4.-Cementerio Punta Mulatos (CCPM)	24,3
5.- Cementerio Municipal San Juan de los Morros (CCG)	24,0
6.- Cementerio Municipal Chichiriviche (CCF)	24,0
7.- Cementerio Municipal Mariño (CCM)	24,2
8.- Cementerio Municipal de San Félix (CCB)	24,2
9.-Cloaca (Parque del Este) (CPE)	24,5

### **Sitios variables o polimorfismo:**

El alineamiento de 68 secuencias de *Cx. quinquefasciatus* muestra que 27,06% de los sitios fueron polimórficos y 13,88% filogenéticamente informativos. Porcentajes de sitios polimórficos pertenecientes a cada población se muestran en la (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Porcentaje de sitios polimórficos del gen **ND5**, correspondientes a las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de las diferentes localidades estudiadas.

Pob.	Nº de muestras	Sitios variables	% de sitios polimórficos
CCT	9	42	9,88
CGS	9	58	13,64
CH	9	33	7,76
CPM	10	27	6,35
CG	8	27	6,35
CF	7	48	11,29
CM	9	24	5,64
CB	8	53	12,47
PE	2	14	3,29
TOTAL	68	115	27,06

Leyenda: Cementerio de la Colonia Tovar (CCT); Cementerio General del Sur (CGS); Cementerio del Hatillo (CH); Cementerio Punta Mulatos (CPM); Cementerio Municipal San Juan de los Morros (CG); Cementerio Municipal Chichiriviche (CF); Cementerio Municipal Mariño (CM); Cementerio Municipal de San Félix (CB); Cloaca (Parque del Este) (PE)

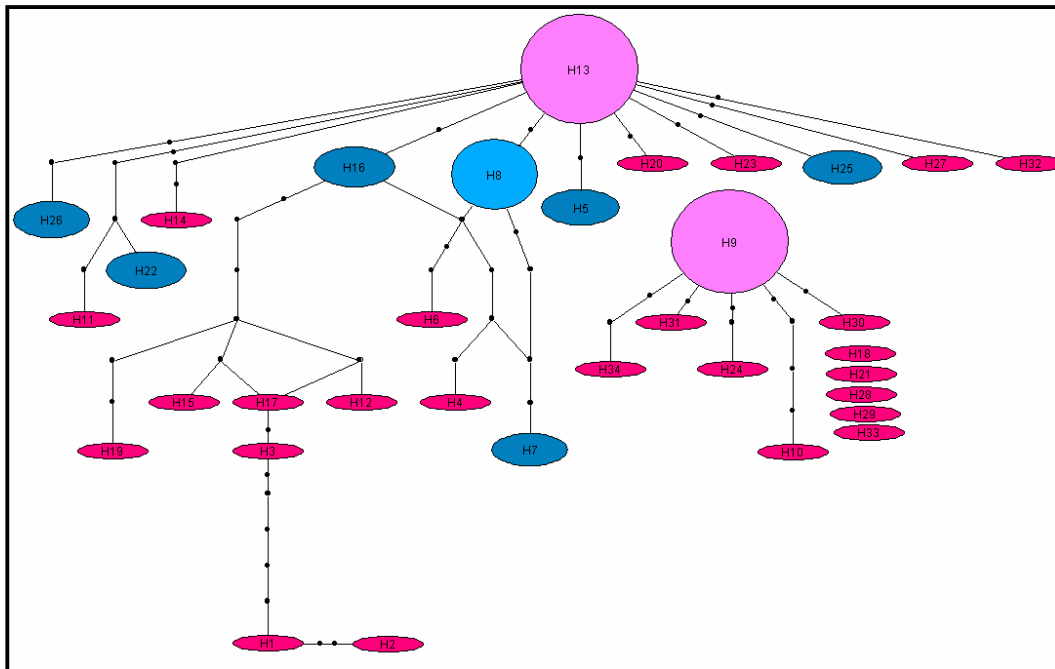
### **Haplotipos obtenidos:**

El alineamiento de 425pb del gen ND5 mostró 115 sitios variables definiendo 33 haplotipos (**Tabla 12**) diferentes en un total de 68 muestras de *Cx. quinquefasciatus* de los diferentes cementerios muestreados.

**Tabla 12.** Frecuencia de haplotipos para el gen ND5 encontrados en un total de 68 individuos de *Cx. quinquefasciatus* pertenecientes a los diferentes cementerios de las localidades estudiadas.

Hap	Poblaciones	N° de Individuos	Códigos de las muestras	Frecuencia
H1	Parque del Este	1	8ND5	0,25
H2	Parque del Este	1	5ND5	0,25
H3	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS02	0,25
H4	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS01	0,25
H5	Cementerio General del Sur	2	Cq-CGS10 Cq-CGS07	0,05
H6	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS04	0,25
H7	Cementerio General del Sur	2	Cq-CGS08 Cq-CGS06	0,05
H8	Cementerio General del Sur Cementerio del Hatillo	5	Cq-CGS05 Cq-CGS03 Cq-CH34 Cq-CH61 Cq-CH62	0,14
H9	Cementerio del Hatillo Cementerio Municipal de San de los Morros Cementerio de la Colonia Tovar Cementerio Municipal San Félix	13	Cq-CH43 Cq-CG11 Cq-CG06 Cq-CG14 Cq-CG03 Cq-CG13 Cq-CB03 Cq-CB04 Cq-CB06 Cq-CB02 Cq-CB11 Cq-CCT31 Cq-CCT32	0,38
H10	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH45	0,25
H11	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH19	0,25
H12	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CPM08	0,25
H13	Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal Mariño Cementerio de la Colonia Tovar Cementerio Municipal de Chichiriviche	13	Cq-CPM09 Cq-CPM13 Cq-CPM26 Cq-CPM20 Cq-CM14 Cq-CM05 Cq-CM10 Cq-CM17 Cq-CF04 Cq-CF06 Cq-CF05 Cq-CCT41 Cq-CCT13	0,38
H14	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM05	0,25
H15	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM36	0,25
H16	Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal de Chichiriviche	2	Cq-CPM37 Cq-CF08	0,05
H17	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM31	0,25
H18	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM03	0,25
H19	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM07	0,25
H20	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM04	0,25
H21	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM01	0,25
H22	Cementerio Municipal Mariño	2	Cq-CM13 Cq-CF07	0,05
H23	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM08	0,25
H24	Cementerio Municipal de San de los Morros	1	Cq-CG02	0,25
H25	Cementerio Municipal de San de los Morros	2	Cq-CG10 Cq-CG04	0,05
H26	Cementerio Municipal de Chichiriviche Cementerio de la Colonia Tovar	2	Cq-CF11 Cq-CCT39	0,05
H27	Cementerio Municipal de Chichiriviche	1	Cq-CF09	0,25
H28	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CB01	0,25
H29	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CB14	0,25
H30	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CB05	0,25
H31	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT37	0,25
H32	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT28	0,25
H33	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT01	0,25
H34	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT21	0,25

El Minimum Spanning Network (**Figura 11**) generado por TCS, ilustra las relaciones de los 34 haplotipos encontrados. Distinguiéndose una estructura de 3 grupos principales en forma similar que para el gen COI. Un grupo estuvo caracterizado por el haplotipo 13 presente en las poblaciones de los cementerios de la Colonia Tovar, Punta Mulatos, Municipal Mariño y Municipal de Chichiriviche. El segundo grupo, representado por el haplotipo 9, en las poblaciones del cementerio Municipal de San de los Morros, Municipal San Félix, Hatillo y Colonia Tovar. Y el tercer grupo, representado por el haplotipo 8, presentes en las poblaciones del cementerio General del Sur y Hatillo. (**Tabla 12**)



**Figura 11.** Minimum Spanning Network entre los haplotipos obtenidos con el gen mitocondrial ND5. Cada punto indica sustituciones de nucleótidos. El número dentro de cada compartimento corresponde al número del haplotipo. El tamaño de cada compartimento es proporcional a la frecuencia de haplotipos encontrados (Ver **Tabla 12**).

El haplotipo más común encontrado fue H9 Y H13, presente con una frecuencia de 0,38 en 13 individuos, en muestras de 4 localidades estudiadas (**Tabla 12**). Las poblaciones de todas las localidades presentaron haplotipos únicos. Las poblaciones del

cementerio Municipal de Chichiriviche comparte un haplotipo (H16) con la población del cementero de Punta Mulatos, un haplotipo (H22) con la población del cementerio Municipal Mariño y un haplotipo (H26) con las poblaciones del cementerio de la Colonia Tovar, los cuales son separados del haplotipo más común por uno y dos (H22 y H26) sitios segregantes respectivamente. El tamaño de muestra por sitios, distribución y frecuencia del resto de los haplotipos se muestran en la (**Tabla 12.**)

### **Diferenciación poblacional:**

#### **Diversidad de haplotipos y Diversidad nucleotídica:**

La diversidad de haplotipos global para el total de las poblaciones de los diferentes cementerios (sin incluir al grupo externo) fue  $H_t$ : 0,924. Dentro de cada población la diversidad de haplotipos obtenidas se muestran en la **Tabla 13**. La diversidad nucleotídica en el total de las muestras fue  $\Pi (t)$ : 0,03457.

#### **Valores de $H_{ST}$ :**

Los valores de  $H_{st}$  correspondientes a las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de cada cementerio estudiado no fueron estadísticamente significativos (**Tabla 13**), indicando que no existe una subdivisión significativa entre las poblaciones de cada localidad muestreada.

#### **Valor de Tajima's D:**

Los resultados obtenidos indican para el total de las muestras un valor de Tajima negativo D (-0,68345), el cual no fue estadísticamente significativo  $P > 0,10$ . Los valores de Tajima para cada población fueron muy variables (**Tabla 13**),



mostrando valores negativos y no significativos estadísticamente para las poblaciones de cinco localidades (Cementerio General del Sur, Municipal de Chichiriviche, Punta Mulatos, Municipal San Félix, Municipal Mariño) y valores positivos para las poblaciones de tres localidades (Cementerio del Hatillo, Colonia Tovar y Municipal de San Juan de los Morros).

**Tabla 13.** Números de haplotipos para el gen **ND5** y valores de diversidad de haplotipos, diversidad nucleotídica y estadístico de Hudson ( $H_{ST}$ ) y valores de Tajima's correspondiente a las poblaciones de cada localidad estudiada.

Pob.	Nº de Haplotipos	Diversidad de haplotipos de subpoblación (Hs)	Estadístico de Hudson (HST)	Tajima's D
CCT	7	0,944	0,008 P: 0,9307	0,90917 P > 0.10
CGS	6	0,917	0,01 P: 0,401*	-0,08905 P > 0.10
CH	4	0,900	0,000 P: 0,9908	0,70930 P > 0.10
CPM	7	0,867	0,063 P: 0,302*	-1,22910 P > 0.10
CG	3	0,607	0,013 P: 0,9097	0,69583 P > 0.10
CF	5	0,857	0,97 P: 0,3234	-1,03019 P > 0.10
CM	6	0,833	0,059 P: 0,8076	-1,40430 P > 0.10
CB	4	0,643	0,30 P: 0,0203*	-1,51639 P > 0.10
PE	2	1,000	0,07 P: 0,2437*	No aplicable
Haplotipos Totales	34			
Diversidad de haplotipos total ( $H_T$ )	0,924			

\* significativo

### **Distancias Genéticas:**

Las distancias genéticas, indicaron valores K2P intra-especie entre 0- 7 % (0-1,6% entre *Cx. quinquefasciatus* tanto del **Clado BC** como del **Clado C** y 2-7% entre *Cq* del **Clado BC** y **C**, Apéndice 2) para *Cx. quinquefasciatus*, de 0,2-1,1% para *Cx. corniger*, de 0,2% para *Aedes aegypti* y 0,4% para *Aedes albopictus*. Especies cercanamente relacionadas mostraron distancias entre 0,4-10 %, tal es el caso de *quinquefasciatus* y *corniger* pertenecientes al género *Culex*, mientras que para las especies *aegypti* y *albopictus* del género *Aedes* los valores de distancias estuvieron

entre 10-10,8 %. Los valores de distancias genéticas entre géneros oscilan entre 11,4 a 11,7%.

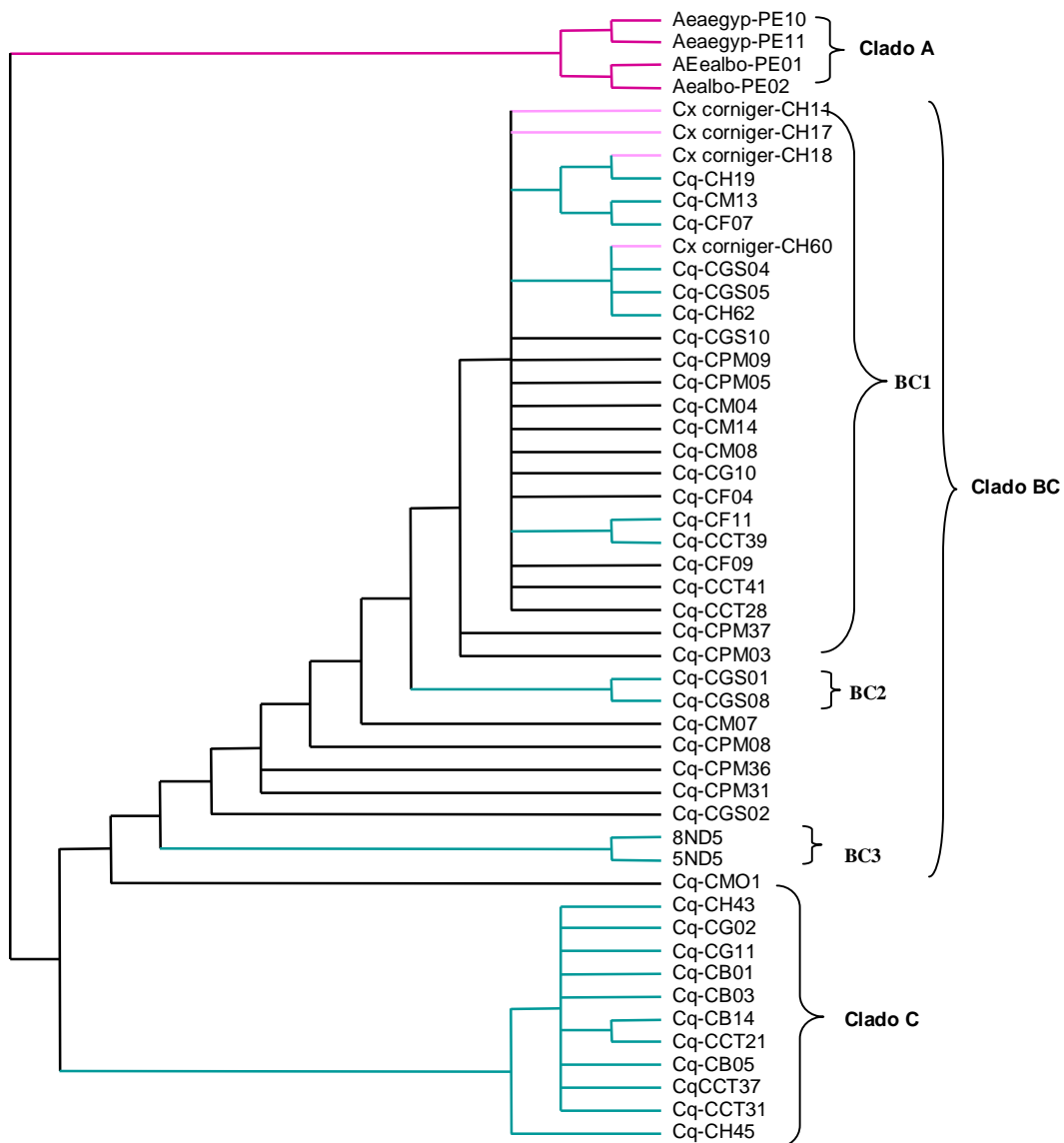
### **Análisis filogenéticos:**

Un total de 50 secuencias provenientes de 4 especies y 425 nucleótidos como caracteres fueron alineadas y usadas en el análisis del gen **ND5**. Del total de caracteres, 310 fueron constantes, 38 no informativos y 77 informativos para parsimonia. Los análisis con los caracteres tratados con igual peso y con caracteres repesados realizados con 1000 replicas, arrojaron los siguientes resultados de estadística descriptiva (**Tabla 14**):

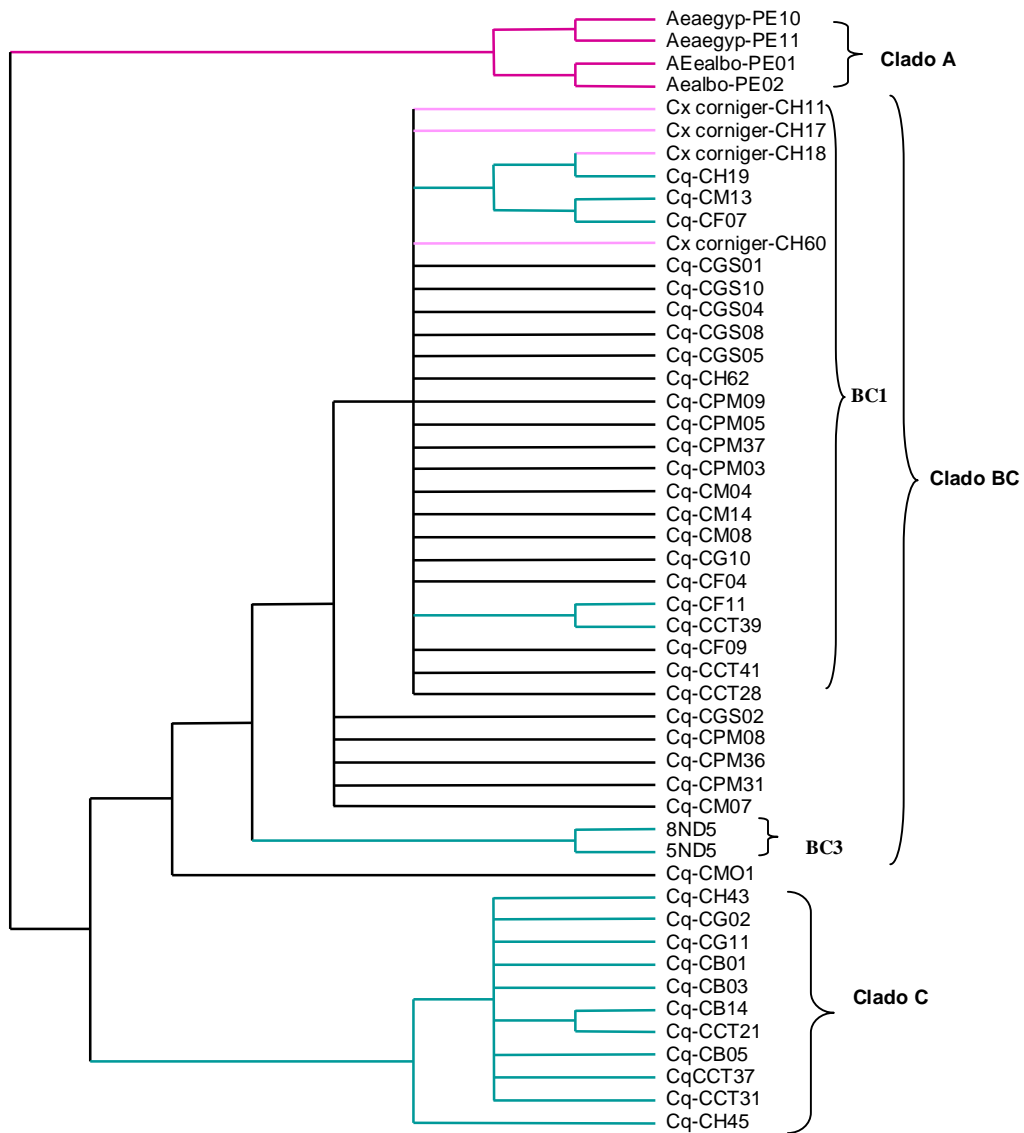
**Tabla 14.** Números de soluciones, longitudes de los árboles (L), los índices de consistencias (IC), los índices de retención (IR) y los índices de homoplasias (IH) obtenidos en los análisis de parsimonia.

Gen ND5	Soluciones	Longitud (L)	Índice de consistencia (IC)	Índice de retención (IR)	Índice de homoplasias (IH)
Árboles parsimoniosos, caracteres con igual peso.	301	179	0,765	0,913	0,235
Árboles parsimoniosos, caracteres repesados	80	142	0,859	0,941	0,141

Las topologías en cada análisis (pesos iguales y repesados) no muestran diferencias en la agrupación interna del ingroup en estudio al igual que para el gen COI. El análisis con repesado de caracteres mostró 80 soluciones con topologías iguales a las obtenidas con los caracteres tratados con igual peso (**Figura 12**). Dos topologías se conservan en ambos análisis, que se remiten a la presencia de un clado interno BC3 y Clado C, que también se mantiene en el consenso estricto (**Figura 13**).



**Figura 12.** Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de los 80 árboles obtenidos para el gen **ND5**, mediante el análisis heurístico con TBR de 50 taxa (34 haplotipos) por 425 caracteres (pb), caracteres repesados y gaps tratados como datos perdidos. Se incluyen las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de cada cementerio de diferentes localidades del territorio y los grupos de referencia. Se incluye dos especies de *Aedes aegypti* y *albopictus* como grupos externos y *Cx. corniger* como grupo hermano.



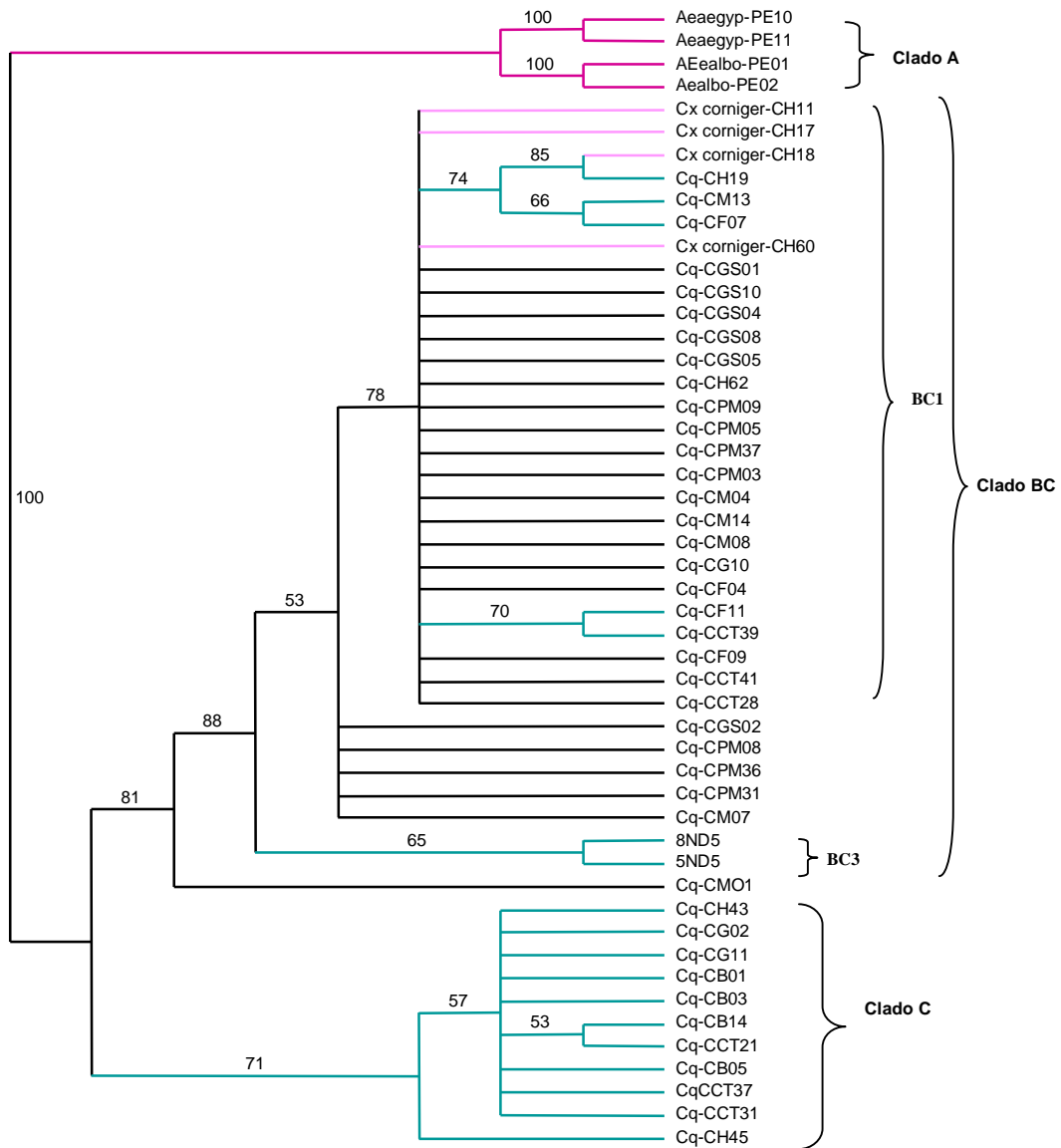
**Figura 13.** Consenso estricto de los 80 árboles obtenidos para el gen ND5. Caracteres repesados.

Tres clados principales monofiléticos y con apoyo de remuestreo se pueden observar en los resultados obtenidos (**Figura 12 y Figura 13**). El **Clado A** representado por el género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*), el **Clado BC** representado por secuencias de *Culex corniger* y secuencias de *Culex quinquefasciatus* y el **Clado C**, representado por secuencias de *Cx. quinquefasciatus* (**Cq**) de 4 cementerios estudiados. El **Clado BC** en las soluciones obtenidas por búsqueda heurística con caracteres tratados con igual peso

y caracteres repesados, puede ser dividido en 3 subclados **BC1** (*Cx. corniger* CH11-CPM03) el cual a su vez tiene tres subdivisiones; **BC2** (CGS01-CGS08) Y **BC3** (8ND5-5ND5).

En todas las topologías obtenidas y en el consenso, el **Clado A** se ubica basalmente, ubicándose internamente y en una politomia (clado no resuelto) las secuencias de *Cx. quinquefasciatus* con los *Cx. corniger* en posición parafilética de acuerdo a la clasificación actual (**Clado BC** y **C** respectivamente).

El análisis de re-muestreo o bootstrapping realizado con 500 replicas (**Figura 14**), muestra a las secuencias pertenecientes al **Clado A** como grupo basal apoyado con un 100% y diferenciada de todas las secuencias de *Cx. quinquefasciatus* junto con *Cx. corniger* derivadas internamente con un valor de apoyo de 100%. Internamente con un 71% se encuentra el **Clado C** y con un 81% de apoyo el **Clado BC** del cual se deriva dos ramas más interna, el subclado **BC1** con 78% de apoyo mostrando una gran politomia con secuencias de *Cx. quinquefasciatus* y *Cx. corniger* (definiéndose unos grupos más internos con menor porcentajes de apoyo) y el subclado **BC3** con 65%.



**Figura 14.** Árbol resultante del remuestreo o análisis Bootstrapping para el gen ND5 en 50 taxa (34 haplotipos) de *Culex quinquefasciatus*

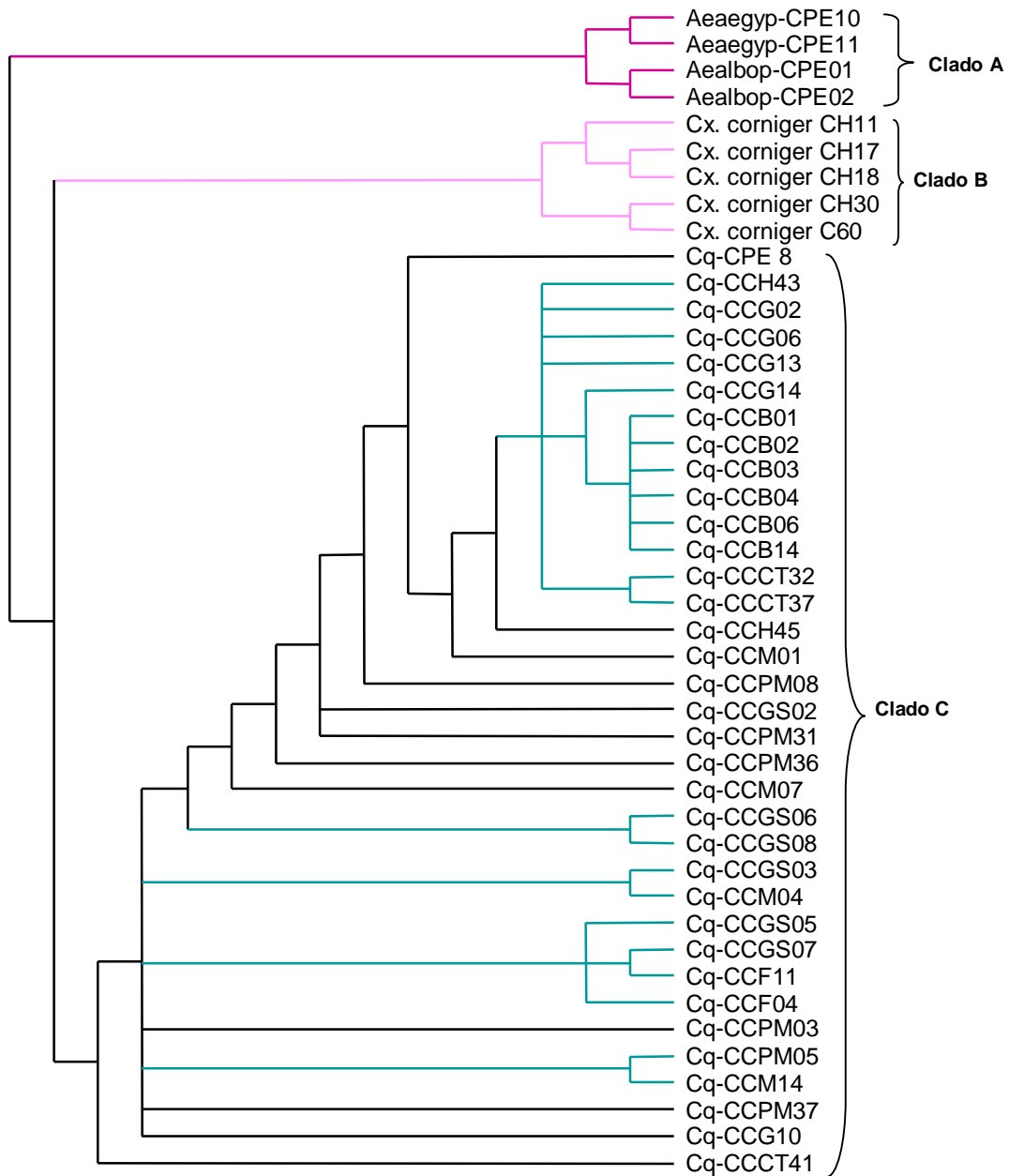
## **PRUEBA DE HOMOGENEIDAD (COI+ND5)**

La combinación, en una matriz única, de los genes COI y ND5 de un total de 44 secuencias provenientes de 4 especies (*Aedes aegypti* y *albopictus*, *Cx. corniger* y *Cx. quinquefasciatus*) y 966 nucleótidos (542 gen COI y 425 gen ND5) como caracteres, fueron alineadas y usadas en el análisis. La prueba de homogeneidad mostró un valor de probabilidad de **P=1**. Estos resultados indican que no se encuentran conflictos entre las particiones y por lo tanto las matrices de datos pueden ser combinadas. Del total de caracteres, 699 fueron constantes, 67 no informativos y 200 son informativos para parsimonia. Los análisis con los caracteres tratados con igual peso y con caracteres repesados realizados con 1000 replicas en la búsqueda heurística, arrojaron los siguientes resultados (**Tabla 15**):

**Tabla 15.** Números de soluciones, longitudes de los árboles (L), los índices de consistencias (IC), los índices de retención (IR) y los índices de homoplasias (IH) obtenidos en los análisis de parsimonia para la combinación del gen COI+ND5.

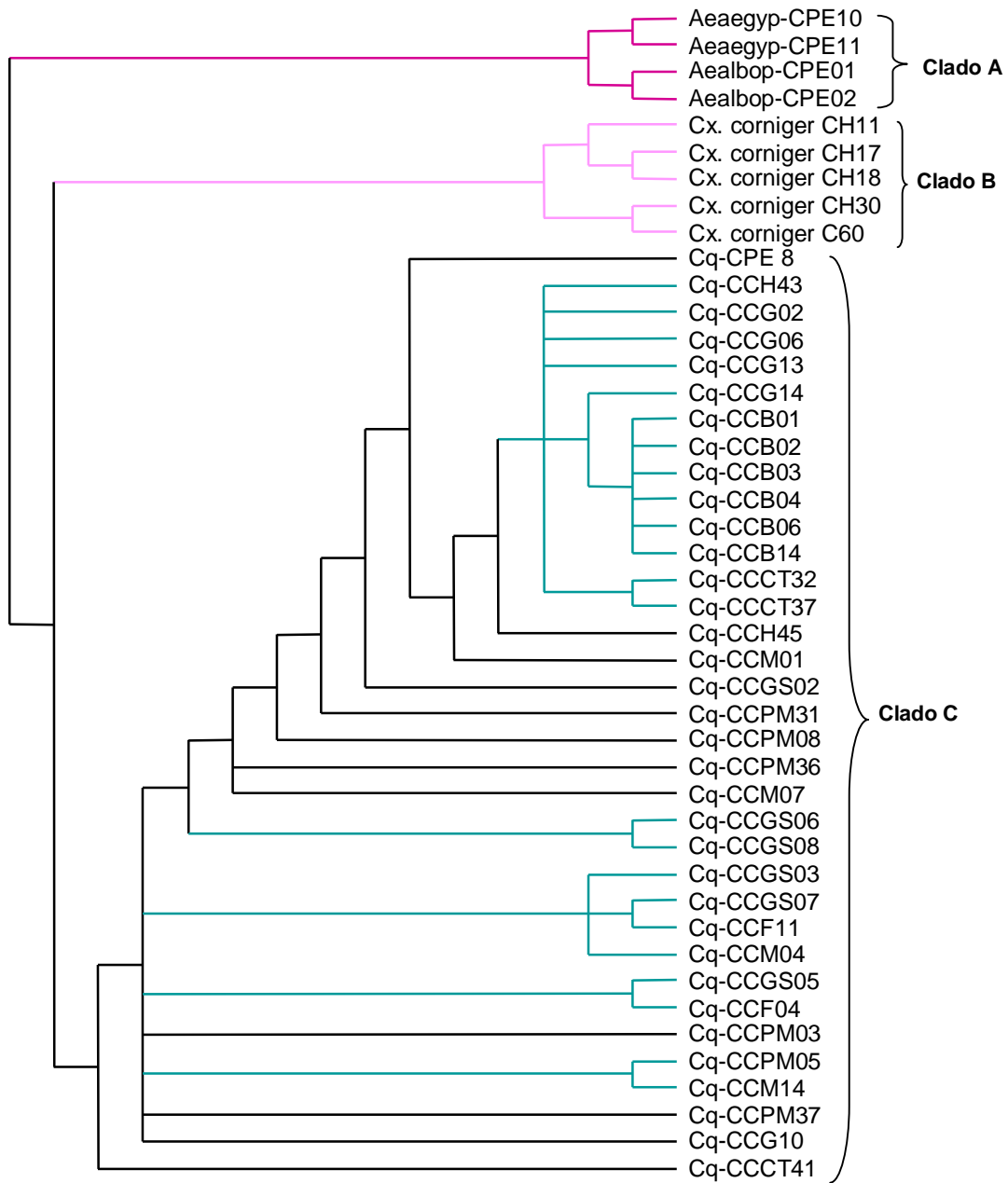
Gen COI +ND5	Soluciones	Longitud (L)	Índice de consistencia (IC)	Índice de retención (IR)	Índice de homoplasias (IH)
Árboles parsimoniosos, caracteres con igual peso.	60	406	0,764	0,899	0,236
Árboles parsimoniosos, caracteres repesados	12	312	0,861	0,934	0,139

Las topologías en cada análisis (pesos iguales y repesados) muestran pequeñas diferencias en la agrupación interna del ingroup (**Figura 15** y **Figura 16**), sin embargo al hacer el consenso las topologías obtenidas son idéntica en ambos análisis.



**Figura 15** Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de 60 soluciones obtenidas para la combinación de los genes **COI** y **ND5**, mediante el análisis heurístico + TBR de 46 taxa X 966 caracteres (pb) pertenecientes, caracteres con igual peso y gaps tratados como datos perdidos. Se incluyen las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de cada cementerio de diferentes localidades del territorio y los grupos de referencia. Se incluye dos especies de *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*) como grupos externos y *Cx. corniger* como grupo hermano.

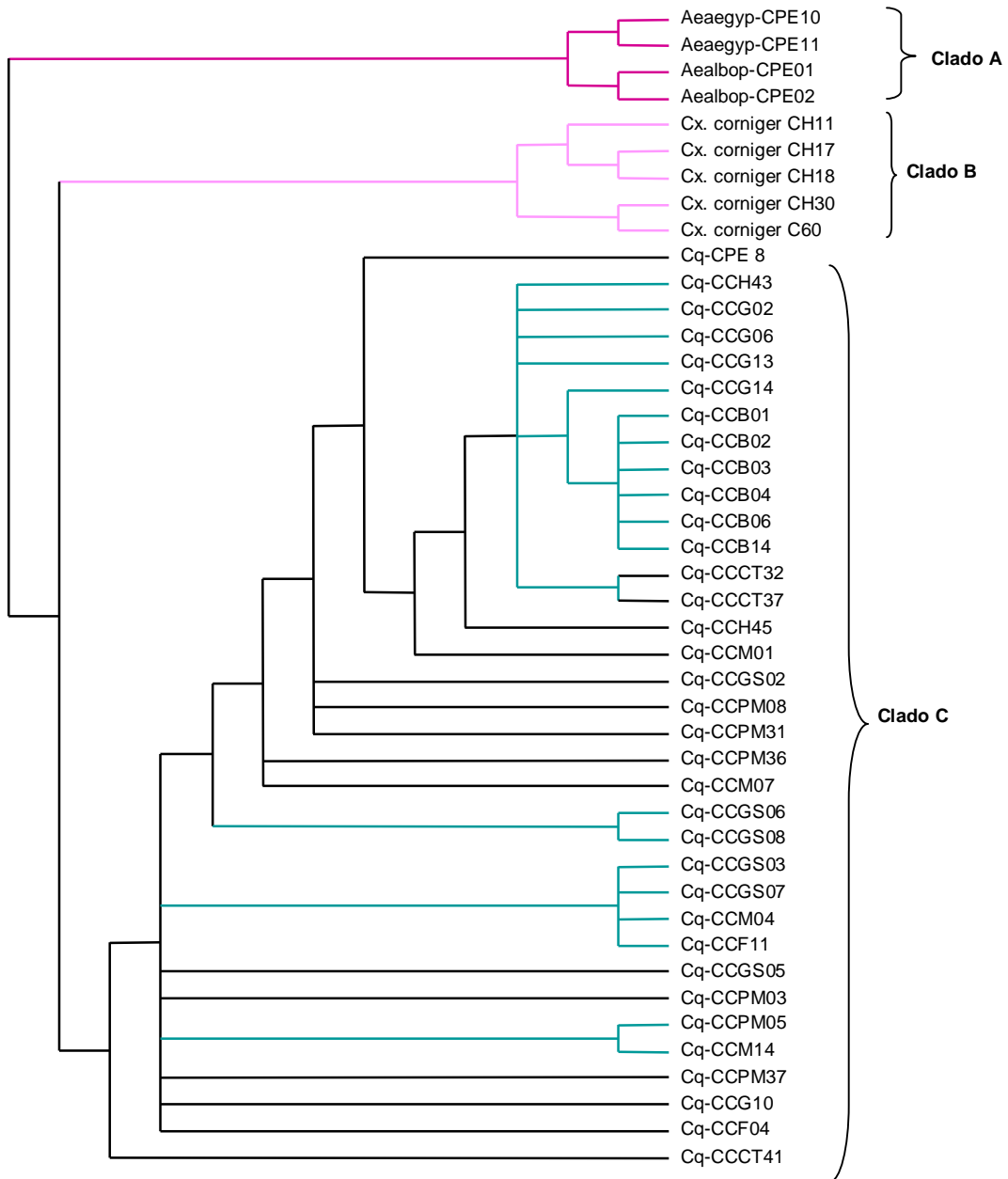




**Figura 16** Una de las soluciones igualmente parsimoniosas de 12 soluciones obtenidas para la combinación de los genes **COI** y **ND5**, mediante el análisis heurístico + TBR de 46 taxa X 966 caracteres (pb) pertenecientes, caracteres repesados y gaps tratados como datos perdidos. Se incluyen las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de cada cementerio de diferentes localidades del territorio y los grupos de referencia. Se incluye dos especies de *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*) como grupos externos y *Cx. corniger* como grupo hermano.

En ambos análisis así como en el consenso (**Figura 17**), se obtuvo una estructuración donde las secuencias pertenecientes al género *Aedes* (**Clado A**) corresponden al grupo basal y diferenciada de todas las secuencias internas,

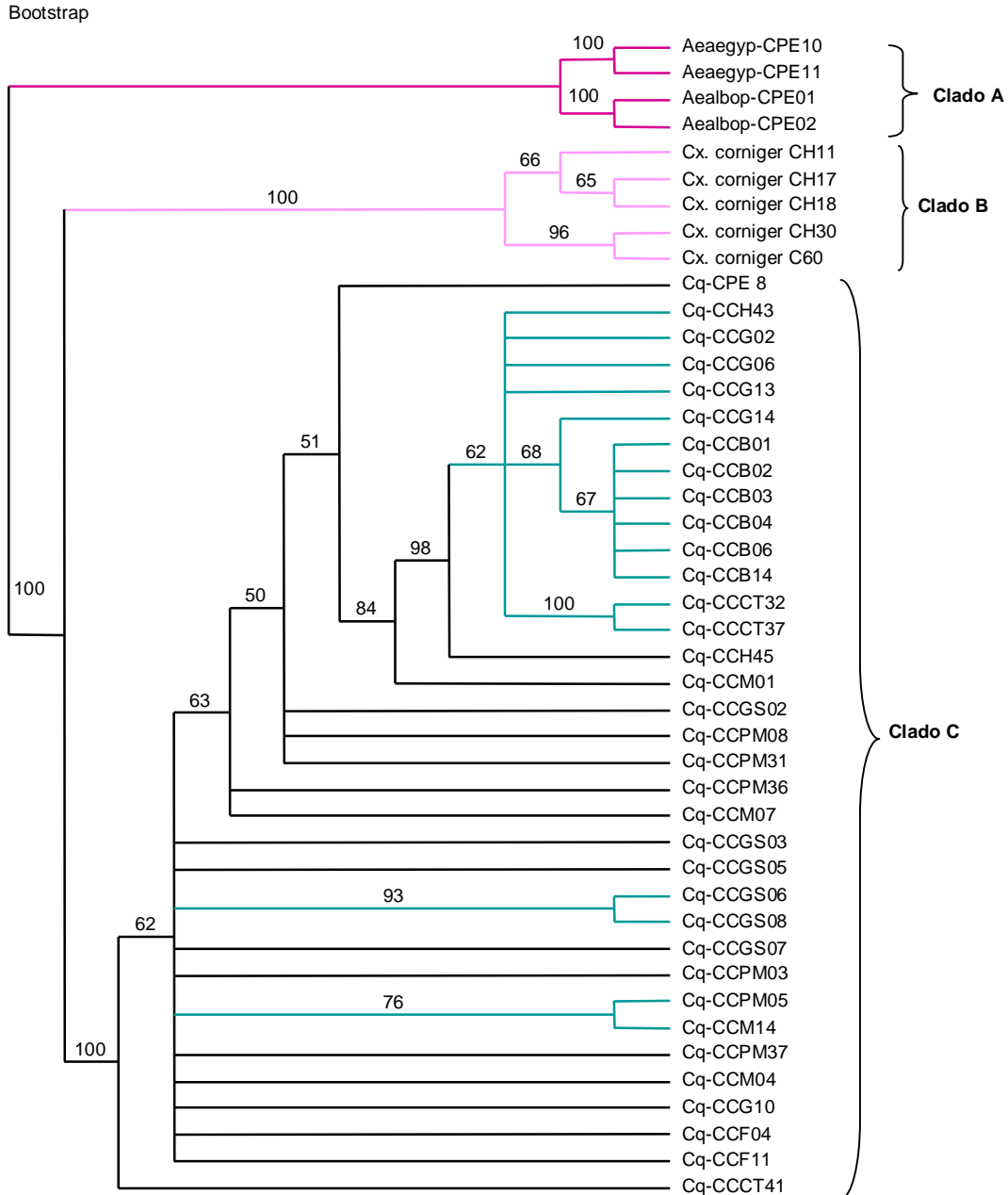
observándose dos clados, **Clado C** para *Cx. quinquefasciatus* y **Clado B** para *Cx. corniger*.



**Figura 17.** Consenso estricto de los 12 árboles obtenidos para la combinación de los genes **COI** y **ND5**. Caracteres repesados.

Por tanto a pesar de observarse diferencias entre los clados reconstruidos en los análisis individuales, en el combinado se observa una reconstrucción similar a lo obtenido para el gen **COI**, mostrando valores de soportes muchos más bajos a los

obtenidos para cada gen en particular. En el análisis de re-muestreo o bootstrapping realizado con 500 replicas (**Figura 18**) se observa a las secuencias pertenecientes al **Clado A** como grupo basal, derivándose internamente el **Clado B** y **Clado C** con un apoyo de 100% para ambos clados y diferenciados entre sí con un valor de apoyo de 100%. El **Clado C** a su vez, se muestra como una politomía observándose algunos subclados con valores de apoyo de grupo muy bajos.



**Figura 18.** Árbol resultante del remuestreo o análisis Bootstrap para la combinación de los genes COI+ ND5 en 44 taxa de *Culex quinquefasciatus*. 500 réplicas (Análisis de parsimonia).

## DISCUSIÓN

La longitud de las secuencias para ambos genes fue la esperada de acuerdo a los reportes de los trabajos en donde se han utilizado para otras especies de mosquitos. Se observaron diferencias en el contenido de G+C correspondiente a cada gen, presentando un porcentaje mayor el gen COI respecto al gen ND5. Sin embargo no se observó una variación significativa en el porcentaje de G+C entre las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de las diferentes localidades estudiadas, ni una correlación diagnóstica con otras especies de mosquitos. Igualmente, no se encontró ninguna correlación entre la longitud de la secuencia con el contenido de G+C ni con algún patrón de característico o diagnóstico para las poblaciones estudiadas así como para las especies de referencia utilizadas.

En trabajos previos, niveles bajos de variación genética (polimorfismo) han sido reportados para poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* haciendo uso del gen mitocondrial COII, el factor de elongación nuclear 1-alpha y acetilcolinesterasa-2 (ACE) como genes nucleares (Hasan y col., 2009) revelando adicionalmente, la ausencia de estructuración genética entre poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* entre distintas localidades. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, revelan niveles altos de variación genética tanto para el gen COI como para ND5. Esta diferencia es corroborada al verificar secuencias de Envanic para esta especie y COI no publicadas (Sharma data no publicada), cuyos análisis de polimorfismos (no mostrados) revelan valores similares a los mostrados en este trabajo, develando así una diferencia notable entre ambos genes (COI y COII) para una misma especie.

Particularmente para el gen ND5 dentro de *Cx. quinquefasciatus* los niveles de variación encontrada fueron altos en contraste a secuencias de ND5 de otras poblaciones de mosquitos, como por ejemplo *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (Birungi y Munstermann, 2002; Mousson y col., 2005 y Brown y Munstermann, 2009). Mientras que el gen COI comparativamente con ND5 reveló niveles de variación menor dentro de *Cx. quinquefasciatus*, pero en contraste a secuencias de COI de otras poblaciones de dípteros el nivel de variación fue alto (Arrivillaga y col. 2002; Mousson y col. 2005). Es de resaltar que no existía información sobre ND5 en esta especie.

Se conoce que el gen ND5 es considerado uno de los genes mitocondriales más variables (Besansky y col., 1997), mientras que el gen COI es mucho más conservado (Cook y col., 2005). Esta condición se corresponde con los resultados obtenidos en cuanto al grado de polimorfismo obtenido, mostrando que éste fue mucho mayor para el gen ND5 que para el gen COI no obstante de las diferencias en longitud que existen entre ambos genes (425pb y 542pb respectivamente). Sin embargo, en ambos casos el grado de polimorfismo observado en *Cx. quinquefasciatus*, varía dependiendo de la localidad, presentando un porcentaje mayor de sitios variables las poblaciones de los cementerios de Punta Mulatos y Hatillo (Vargas y Distrito Capital) amplificadas con el gen COI y en Cementerio General del Sur (DC) para ND5, y menor porcentaje para el cementerio Municipal Mariño (Maracay) en ambos genes analizados.

Por tanto, de acuerdo al grado de polimorfismo, se puede decir que, la variación “dentro” y “entre” en las poblaciones para el gen COI fue baja con relación al gen ND5 que presentó una alta variación “dentro”, pero la variación “entre” poblaciones fue baja.

Las diferencias y variaciones entre las localidades en cuanto al grado de polimorfismos puede estar relacionado con la influencia de presiones antropogénicas, por ejemplo, la aplicación intensiva de insecticidas el cual se considera un proceso ecológico reciente producto del actividad humana.

En Venezuela, *Cx. quinquefasciatus* no ha sido objeto de control directo por parte de las autoridades sanitarias, sin embargo, el uso frecuente de insecticidas en las campañas de control de dengue y *Aedes aegypti* (e inclusive insecticidas contra plagas agrícolas), en algunas de las localidades donde se llevaron a cabo los muestreos, tal es el caso de Maracay (Cementerio Mariño) estado Aragua (PAHO, 1990 citado en Pérez y Darjaniva , 2009), puede estar influyendo en el bajo polimorfismo de *Cx. quinquefasciatus* particularmente para esta localidad, así como la frecuencia con la que aparecen en la población. Caso contrario podrían ser las localidades del Cementerio El Hatillo y Punta de Mulatos las cuales no tienen una historia de aplicaciones como Maracay por ser ésta una entidad endemo-epidémica para Dengue.

Por lo tanto, las actividades de control puede considerarse un factor que contribuye a la reducción de la variabilidad, tal y como se observó en las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* del cementerio Municipal Mariño con bajo número de haplotipos y de polimorfismos. No obstante, a pesar de lo señalado anteriormente la variabilidad encontrada en *Cx. quinquefasciatus* con relación a lo reportado para otras especies de dípteros sigue siendo alta. Sin embargo, cabe destacar según Tajima (1989), que la pérdida de diversidad a pesar de las extensivas medidas de control en insectos no puede ser fácilmente reconstruida en el curso de pocas generaciones.

En este sentido, el hecho de que éstas poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* sean resistentes a la mayoría de los insecticidas (Salazar, 2010) debe permitir el mantenimiento de esa alta variabilidad observada, caso muy diferente a lo que ocurre con algunas especies urbanas pertenecientes al género *Aedes*. Este hecho muestra que la selección natural genera estructuras genómicas en respuesta adaptativa al estrés ambiental, como a las condiciones climáticas, geográficas, así como a las presiones por insecticidas (Sharma y col. 2009).

En algunos casos, bajos niveles de variación pudieran ser atribuidos a severos, repetidos y largos periodos de cuellos de botella en la población, resultando en la pérdida de variación genética debido a la deriva genética al azar (Nei y col. 1975). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio no pueden ser considerados como consecuencia de una deriva genética, ya que se requiere de una escala temporal generalmente grande dependiendo del tamaño poblacional (Futuyma, 1998) para poder medir los cambios genéticos que han ocurrido hasta el presente, por lo que es necesario contar con una serie temporal, que pueda soportar este proceso. Condición que en este caso no es viable, ya que no se cuenta con unos estudios previos que nos puedan proporcionar los datos requeridos.

No obstante, el número de sitios polimórficos es mayor para el gen ND5 con respecto al gen COI, las diferencias en el número de haplotipos totales obtenidos para cada gen (34 y 31 haplotipos) no está relacionado directamente con el grado de polimorfismo. Sin embargo, se observó variación en cuanto al número de haplotipos obtenido entre las poblaciones para cada gen y entre los dos genes en su totalidad.

Adicionalmente, el número de haplotipos compartidos entre las poblaciones fue bajo en ambos genes (5 y 3 respectivamente).

Dos ejemplos en mosquitos pueden ser evidencia de resultados contrastantes que puede estar asociado a diferencias intrínsecas de cada especie, en este sentido, Hasan y col. (2009) con *Cx quinquefasciatus* y COII, reportan la presencia de 2 haplotipos únicos con una sola transición en poblaciones de diferentes localidades, obteniendo así una baja diversidad, mientras que Scarpassa y Conn (2006), para un fragmento de 1226 pb del gen COI correspondiente a 45 individuos de *Anopheles oswaldoi* de la Amazonía Brasileña encuentra 123 sitios polimórficos generando 25 haplotipos, en nuestro caso para COI, de 76 individuos (secuencias) se encontraron 88 sitios polimórficos y 31 haplotipos y para ND5 de 68 individuos, se detectaron 115 sitios polimórficos y 34 haplotipos.

Las diferencias genéticas encontradas entre las poblaciones de los diferentes cementerios estudiados tanto para COI como para ND5, y el bajo número de haplotipos compartidos que se observa puede ser evidencia de poco flujo génico entre estas poblaciones o que el bajo número de haplotipos compartidos es consecuencia del tamaño muestral.

El Minimum Spanning Network (**Figura 7 y Figura 11**) es consistente con los patrones esperados para un rango de expansión poblacional y de especies con gran variabilidad (Templeton, 1998). En nuestro caso, los haplotipos H13 y H9 para ND5 y H1 para COI representan la distribución de haplotipos ancestrales y de mayor frecuencia, presentando múltiples conexiones que derivan en haplotipos con menor



frecuencia, debido a que han surgido recientemente y probablemente no han tenido el tiempo suficiente para dispersarse.

No obstante, se observó una discontinuidad entre el total de los haplotipos encontrados, específicamente para los haplotipos (H6 y H14); (H19); (H10) y (H9, H10, H30, H31, H34, H24) ;(H18) ;(H21); (H28); (H29); (H33) en COI y ND5 respectivamente, los cuales no derivaron de los haplotipos más ancestrales o de algunos de los haplotipos más jóvenes. Esto ocurre, debido a que el algoritmo utilizado estima el número máximo de diferencias de pares de bases entre secuencias que pueden atribuirse a una serie de mutaciones únicas en cada sitio de la secuencia; número al que se conoce como límite de parsimonia (con una confianza del 95 %) (Templeton, 2008). El programa no conecta a la red los haplotipos que difieren por un número de pares de bases que exceda dicho límite, por el supuesto de posible homoplasia. Dicho límite puede ser excedido, sin embargo, debido al alto número de muestras incluidas en el análisis esta posibilidad se descarta, ya que, mientras mayor sea el porcentaje de confianza utilizado el número de conexiones que se van a obtener van a ser menores y por ende se van a observar más haplotipos que no derivan del haplotipos ancestral.

Los valores de  $H_{ST}$  fueron calculados sobre la base de la teoría neutral de evolución molecular (Kimura, 1983), que predice que las regiones del genoma que evolucionan a altas tasas también presentan altos niveles de polimorfismo dentro de las especies. Los valores obtenidos no fueron estadísticamente significativos en ambos genes, indicando estos resultados que no existe una subdivisión o divergencia significativa entre las poblaciones de las localidades muestreadas. Por otra parte los valores de diversidad nucleotídica para el total de las poblaciones fue bajo, a pesar de que los cambios

observados (Sitios polimórficos) en las secuencias son altos. Esto es debido a que los haplotipos generados aparecen en baja frecuencia, confirmando esto la no subdivisión o divergencia entre las diferentes poblaciones estudiadas.

El valor de Tajima's D bajo la hipótesis de mutación neutral es cercano a cero (Tajima's, 1989), este valor distingue entre la evolución de una secuencia de ADN al azar ("neutral") y una evolución en virtud de un proceso no-al azar, incluyendo la selección dirigida o la selección estabilizadora. Un valor negativo de D resulta cuando se tiene un exceso de polimorfismo en baja frecuencia, indicando expansión de la población o selección purificadora al azar. Mientras que valores positivos de D, resultan cuando se tiene bajos niveles de polimorfismo en alta frecuencia, indicando una posible disminución en el tamaño de la población (selección estabilizadora).

Para el gen ND5 se obtuvo que los valores de Tajima para el total de la población como para cada población particular fueron negativos y no significativos y valores tanto positivos como negativos cuando se analiza a cada población por separado. Para el gen COI el valor de Tajima obtenido para el total de la población fue estadísticamente significativo y negativo (expansión), y sólo para la población del cementerio Municipal Mariño fue estadísticamente significativo y positivo (estabilizadora), con valores mayores a 2 e inferiores a -2.

Los resultados significativos (COI) son consistentes con la hipótesis de mutación neutral. Sugiriendo los valores negativos observados, que los patrones de polimorfismo son evidencia de continua expansión de la población o reciente selección, mientras que los valores positivos sugieren y apoyarían como en el caso de Mariño una disminución

del tamaño poblacional y de los sitios polimorficos producto de la aplicación de insecticidas. Los resultados para Colonia Tovar y General del Sur (Tajima positivos), aunque no significativos se ajustarían también a evidencia de aplicación continua de insecticidas, en un caso contra plagas agrícolas (CCT) y en el otro (CGS) contra vectores de dengue.

En los análisis cladísticos realizados, para el gen COI, las distancias y la estructuración filogenética de los clados obtenidos muestran una marcada divergencia para COI entre géneros *Aedes* y *Culex*, y entre dos especies de *Culex* de subgéneros diferentes (*corniger* y *quinquefasciatus*). Hernández (2006) con COI, reporta distancias entre 4 y 7,5% entre especies de *Culex* cercanamente relacionadas pero pertenecientes a un mismo subgénero (*Melanoconion*), lo que explica nuestros resultados de 12,44-12,89% entre especies de *Culex* pertenecientes a subgéneros diferentes, y distancia de 2% intra- especie, valor muy cercano (0,1-2,8%) a lo obtenido para las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* por lo que se puede decir que el **Clado C** en su totalidad corresponde a una sola entidad filogenética (*Cx. quinquefasciatus*) con un apoyo de 100%, ya que no se observó ninguna distinción entre las poblaciones no correlacionada con diferenciación geográfica y con los haplotipos únicos encontrados en cada localidad. De esta forma el gen COI estudiado muestra menos variabilidad y define mejor los clados correspondientes con la clasificación taxonómica actual.

En los análisis para ND5, los valores de distancia y estructuración de los clados muestran marcadas divergencias para este gen entre géneros (*Aedes* y *Culex*), pero no entre especies del mismo género (*Cx. corniger* y *Cx. quinquefasciatus*) y entre poblaciones de una misma especie (*Cx. quinquefasciatus*). Sin embargo, se puede

observar también en los árboles obtenidos que existe una separación entre especies diferentes pertenecientes al género *Aedes*, lo cual puede ser deberse a que este gen se muestra más conservado y con baja variabilidad genética para estas especies demostrado por Birungi y Munstermann, 2002; Mousson y col., 2005 y Brown y Munstermann, 2009, Navarro y col., datos no publicados (*albopictus* de Venezuela) siendo trece sitios polimórficos el mayor número reportado en ambas especies.

En el caso particular de *Cx. quinquefasciatus*, los valores de distancias reportados dentro de las poblaciones fue similar a los valores de distancias obtenidos cuando se compara con *Cx. corniger*, generándose los **Clado BC** y **C** mostrados con un 81 y 71 % de apoyo respectivamente (**Figura 12**), los cuales no indican una separación asociada a las diferencias de localidades ya que todavía se siguen observando agrupamientos de individuos pertenecientes a cementerios diferentes. Por tanto, esta topología está más asociada a la alta tasa de mutación que presentan ambas especies con respecto a dicho gen. No considerando la posibilidad de tener individuos diferentes a *Cx. quinquefasciatus* ya que por los resultados obtenidos con el gen COI y comprobaciones morfológicas así como el Blast hecho a cada secuencia, se corrobora que las muestras utilizadas corresponden a una misma entidad.

Filogenéticamente los resultados obtenidos para el gen ND5, sugieren que al menos para especies cercanas evolutivamente pertenecientes al género *Culex*, no resulta útil para estudios de sistemática y taxonomía (definición de especie filogenética). Por otra parte su utilidad en estudios genéticos poblacionales dependerá de la verificación de estos análisis con otras especies de *Culex*.

Por otra parte los clados observados dentro del subclado **BC1** se ubican secuencias verificadas de *Cx. corniger* y *Cx. quinquefasciatus* idénticas, también podrían sugerir que entre las dos especies ocurrió entrecruzamiento o es evidencia de introgresión mitocondrial. En ambos casos, las condiciones de simpatría en microhábitats y superposición de generaciones ocurre entre las especies *Cx. corniger* y *Cx. quinquefasciatus* en las mismas localidades geográficas, cementerios, y criaderos comunes (floreros).

Evidencia de introgresión mitocondrial ha sido reportado por Donnelly y col. (2004) para especies del complejo *Anopheles gambiae* con el gen ND5, debido a que haplotipos ancestrales observados para el gen ND5 se mantienen en ambas especies, no estando las especies en simpatría. Esto sugeriría, para *Cx. quinquefasciatus* y *corniger* no habría una barrera reproductiva entre ambas especies, más aún considerando el hecho de que ocupan el mismo tipo de hábitat y están ampliamente distribuidas. Esta inferencia podría explicar el **Clado BC** obtenido en los análisis filogenéticos. El apoyo a una de las hipótesis referidas requeriría de profundos análisis posteriores.

Por otra parte, la información aportada por las secuencias obtenidas para el gen COI sugiere que es un gen funcional para estudios de sistemática y taxonomía, así como para estudios poblacionales definiendo claras relaciones a nivel de géneros así como entre especies cercanamente relacionadas. Además resulta ser un buen marcador de las relaciones evolutivas entre poblaciones de una misma especie y entre especies cercanas lo cual lo hace de importancia filogenética (Navarro y col., 2009).

El resultado de la prueba de homogeneidad para la combinación de los genes COI y ND5 mostró un valor de 1. Indicando que no existe un conflicto entre las particiones (matrices de COI y ND5) y por lo tanto ambos genes pueden ser combinados para un análisis conjunto. Sin embargo, a pesar de que se mantiene la resolución de los clados de grupos de referencias como se observa en la reconstrucción individual del gen COI, la estructuración es diferente en los grupos formados en el clado de *Cx. quinquefasciatus*, mostrando valores más bajos de apoyo de grupos, por tanto la homoplasia introducida por los caracteres de ND5 parece estar influyendo en los análisis combinados. No obstante, la matriz combinada no resuelve el clado interno de *Cx. quinquefasciatus*, mostrando igual politomía sin diferenciación de subpoblaciones.

La combinación de datos en los análisis filogenéticos moleculares ha sido motivo de controversias y discusiones, existiendo diferentes puntos de vista sobre el tratamiento que debería darse a los datos obtenidos de diferentes genomas y que pueden mostrar historias evolutivas diferentes (Huelsenbeck y *col.* 1996; Sanderson y Shaffer, 2002), sin embargo en nuestros resultados no se observa conflicto en la hipótesis resultante con respecto a las particiones por separado, dando un apoyo al peso de los caracteres aportados por el gen COI.

Con relación a los resultados obtenidos para cada gen en particular, éstos sugieren que las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de las distintas localidades estudiadas mostraron una alta homogeneidad genética, a pesar del alto grado de polimorfismo observado, reflejándose en ausencia de clados monofiléticos correlacionados con poblaciones de los diferentes localidades/cementerios sin divergencia entre haplotipos. Se encontró alta variabilidad dentro de las poblaciones (poblaciones heterogéneas) con

presencia de diferentes haplotipos pero que no generan ninguna estructuración filogenética (clados monofiléticos) de las poblaciones, apoyando así la hipótesis planteada en este trabajo.

La homogeneidad observada en las poblaciones puede ser resultado de un intervalo de expansión a través de un modo pasivo de dispersión principalmente a través de la actividad humana, ya que se conoce que *Cx. quinquefasciatus* tiene una limitada capacidad de vuelo y dispersión, aunada a la similitud en cuanto al tipo de criadero que esta especie presenta en los diferentes cementerios, manteniéndose así un continuo contacto genético entre algunas poblaciones locales establecidas. Esta homogeneidad observada resulta importante desde el punto de vista de las medidas de control de vectores, ya que sugiere que el control puede ser más eficaz si este se puede ejercer de forma simultánea en múltiples poblaciones de mosquitos.

No obstante, la heterogeneidad observada intrapoblacionalmente puede ser producto de la amplitud de nicho correspondiente a la variedad de criaderos que ocupa esta especie, que va desde floreros en cementerios (como los evaluados en este trabajo) a recipientes artificiales de todo tipo, cauchos, desagües, cloacas, tanques, etc. Abarcando condiciones oligotróficas hasta eutróficas en las condiciones del ambiente acuático de estos criaderos. Esta es una diferencia interesante en comparación con otras especies invasoras como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* que tienen mayor restricción en los tipos de criaderos en cuanto a su condición de material en suspensión, colonizando ambientes de menor concentración de materia orgánica, razón por la cual éstas especies posean una menor heterogeneidad intrapoblacional mostrada en los bajos porcentajes de sitios variables.

Si bien estas especies invasoras de *Aedes* poseen huevos resistentes a la desecación lo que les da un potencial invasor extraordinario, lo cual no posee *Cx quinquefasciatus*, el éxito de ésta última debe estar asociado a su alta variabilidad que le confiere la capacidad de explotar una mayor variedad de recipientes tanto en ambientes urbanos como rurales. Por otra parte, la resistencia a desecación de los huevos en *Aedes*, le confiere mayor vagilidad y segura dispersión en fase latente, lo que seguramente coloca a estas poblaciones en continuos “cuellos de botella” poblacionales, mientras que las poblaciones de *Cx quinquefasciatus* puede encontrarse en continua expansión, lo que resulta en los valores de diversidad de haplotipos y variabilidad intrapoblacional.

Finalmente, los cambios genético poblacionales en esta especie pudiesen estar determinados en gran medida por la disminución poblacional por el efecto de insecticidas en localidades de alta presión por enfermedades endémicas-epidémicas como el Dengue, o por la acción de prolongados períodos de sequía que reducirían la disponibilidad de criaderos sumado a la ausencia de capacidad de sus huevos a permanecer viables en ausencia de agua.



## CONCLUSIONES

Se logró determinar la variación genética y haplotípica dentro y entre poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de los diferentes cementerios muestreados, tanto para el gen **COI** como para **ND5** concluyendo que:

- El gen ND5 presentó una variabilidad mayor al gen COI. Adicionalmente, la variabilidad observada con respecto a otras especies de mosquitos reportadas para ambos genes fue considerablemente más alta.
- El gen COI mostró baja variabilidad genética (bajo porcentajes de sitios polimorficos) *dentro* y *entre* las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de diferentes localidades.
- El gen ND5 mostró alta variabilidad genética (alto porcentaje de sitios polimórficos) *dentro* y baja variabilidad (bajo porcentaje de sitios polimórficos) *entre* las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de las diferentes localidades.
- El número de haplotipos encontrados en COI y ND5 fue alto (31 y 34 respectivamente). Observándose haplotipos compartidos entre individuos de *Cx. quinquefasciatus* de diferentes localidades, así como haplotipos únicos.

Las relaciones intra e interpoblacionales de *Culex quinquefasciatus* resultantes de filogenia intraespecífica, permiten inferir que:

- La estructuración filogenética intraespecífica observada para ambos genes (**COI** y **ND5**) evidenció que las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* entre las diferentes localidades estudiadas fueron homogéneas mostrando politomías, es decir, no se encontraron clados monofiléticos internos, acordes con una estructuración subpoblacional.
- La filogenia para COI mostró diferenciación en clados (monofilia) para los grupos basales de referencia *Aedes aegypti* y *albopictus*, *Cx corniger*) y para el grupo interno en estudio (*Cx quinquefasciatus*) como grupos naturales o especies filogenéticas. Los análisis con COI son útiles para inferencias entre especies y poblaciones.
- La filogenia para ND5 mostró diferenciación entre el grupo de referencia y el género *Culex*, sin recuperar la monofilia para *Culex corniger* y *Culex quinquefasciatus*, observándose una parafilia entre las dos especies producto de la alta tasa mutacional y posible saturación de posiciones. Este resultado no permite evaluar su utilidad en la inferencia poblacional.
- La presencia de secuencias ND5 idénticas entre las especies de *Culex* podría ser explicada por varias posibilidades: convergencia por la alta tasa mutacional, entrecruzamiento (híbridos), o evidencia de introgresión. Estos resultados requerirán de estudios posteriores.
- La homogeneidad genética observada entre dichas poblaciones pueden ser resultado de un rango de expansión, por medio de un modo pasivo de dispersión

principalmente a través de la actividad humana, debido a la baja vagilidad y poca capacidad de dispersión intrínseca de la especie.

- Presiones antropogénicas, como la aplicación intensiva de insecticida destinada al control de las poblaciones de *Aedes* o de plagas agrícolas, parecen influenciar por vía indirecta la variabilidad genética observada en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de acuerdo a los resultados observados en aquellos cementerios con mayor presión de control (Maracay, Colonia Tovar y CGS).
- El éxito de esta especie urbana parece estar asociado a su alta variabilidad que le confiere la capacidad de explotar una mayor variedad de recipientes tanto en ambientes urbanos como rurales.
- No se obtuvo evidencia de un flujo genético considerable entre las poblaciones, debido al bajo número de haplotipos compartidos entre las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de los diferentes cementerios así como las diferencias genéticas observadas. Lo cual debería ser corroborado aumentando el tamaño muestral por cementerios.

**Apéndice 1.** Matriz de distancias pareadas (divergencia) por Kimura- 2 – parámetros, utilizando máxima parsimonia (Especies de *Culex quinquefasciatus* de diferente localidades estudiadas incluyendo los grupos externo, *Aedes aegypti* y *albopictus* y *Culex corniger*). Gen COI.

	1	2	3	4	5	6	7	
1 Aeaegyp-CPE10	-							
2 Aeaegyp-CPE11	0.00000	-						
3 Aealbop-CPE01	0.14073	0.14073	-					
4 Aealbop-CPE02	0.14062	0.14062	0.00931	-				
5 Culex corniger 1	0.13125	0.13125	0.12052	0.12266	-			
6 Culex corniger2	0.13796	0.13796	0.11822	0.12036	0.02639	-		
7 Cx. corniger CH1	0.13577	0.13577	0.11829	0.12044	0.02830	0.00557	-	
8 Cx. corniger CH2	0.16551	0.16551	0.14946	0.14956	0.05775	0.03019	0.02828	-
9 Cx. corniger CH3	0.14262	0.14262	0.12499	0.12715	0.03413	0.01120	0.00558	
10 Cx. corniger CH4	0.18000	0.18000	0.15687	0.15913	0.06585	0.04190	0.03995	
11 Cq-CPE 2	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
12 Cq-CPE 8	0.12444	0.12444	0.14479	0.14700	0.09439	0.09865	0.09656	
13 Cq-CPE 9	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
14 Cq-CCCT41	0.12219	0.12219	0.14240	0.14461	0.09227	0.09648	0.09440	
15 Cq-CCCT44	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
16 Cq-CCCT46	0.12003	0.12003	0.14020	0.14240	0.09019	0.09440	0.09232	
17 Cq-CCCT37	0.12015	0.12015	0.14026	0.14248	0.09025	0.09449	0.09241	
18 Cq-CCPM10	0.13986	0.13986	0.16318	0.16544	0.11147	0.11575	0.11579	
19 Cq-CCPM31	0.12672	0.12672	0.14027	0.14476	0.09229	0.09653	0.09445	
20 Cq-CCPM38	0.12889	0.12889	0.14942	0.15164	0.09863	0.10293	0.10083	
21 Cq-CCPM07	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
22 Cq-CCPM34	0.12441	0.12441	0.14472	0.14693	0.09439	0.09863	0.09654	
23 Cq-CCPM36	0.12444	0.12444	0.14246	0.14467	0.09226	0.09649	0.09441	
24 Cq-CCPM13	0.12223	0.12223	0.14249	0.14470	0.09229	0.09652	0.09443	
25 Cq-CCPM30	0.14669	0.14669	0.15591	0.15815	0.11354	0.11566	0.11786	
26 Cq-CCPM29	0.13540	0.13540	0.15393	0.15616	0.10926	0.11143	0.11148	
27 Cq-CCPM05	0.14656	0.14656	0.16765	0.16993	0.11793	0.12005	0.12008	
28 Cq-CCM07	0.12223	0.12223	0.14249	0.14470	0.09229	0.09652	0.09443	
29 Cq-CCM13	0.13328	0.13328	0.15410	0.15634	0.10720	0.10938	0.10942	
30 Cq-CCH61	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
31 Cq-CCH45	0.12446	0.12446	0.14251	0.14702	0.09442	0.09867	0.09658	
32 Cq-CCH44	0.12451	0.12451	0.14019	0.14470	0.09444	0.09870	0.09661	
33 Cq-CCH43	0.12223	0.12223	0.14249	0.14470	0.09229	0.09652	0.09444	
34 Cq-CCH62	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
35 Cq-CCGS02	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
36 Cq-CCGS01	0.12444	0.12444	0.14479	0.14700	0.09439	0.09865	0.09656	
37 Cq-CCGS08	0.12672	0.12672	0.14489	0.14942	0.09654	0.10083	0.09448	
38 Cq-CCGS05	0.12228	0.12228	0.14259	0.14479	0.09231	0.09656	0.09448	
39 Cq-CCGS03	0.12223	0.12223	0.14249	0.14470	0.09229	0.09652	0.09443	
40 Cq-CCG02	0.12008	0.12008	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
41 Cq-CCG11	0.11584	0.11584	0.13586	0.13807	0.08610	0.09032	0.08826	
42 Cq-CCG06	0.12003	0.12003	0.14249	0.14029	0.09229	0.09652	0.09443	
43 Cq-CCG14	0.12223	0.12223	0.14249	0.14470	0.09229	0.09652	0.09443	
44 Cq-CCG10	0.12446	0.12446	0.14251	0.14702	0.09442	0.09867	0.09658	
45 Cq-CCG03	0.12452	0.12452	0.14029	0.14249	0.09021	0.09443	0.09236	
46 Cq-CCG07	0.12219	0.12219	0.14470	0.14249	0.09437	0.09861	0.09652	
47 Cq-CCG04	0.12883	0.12883	0.14238	0.14688	0.09435	0.09858	0.09437	
48 Cq-CCF04	0.12449	0.12449	0.14489	0.14710	0.09442	0.09869	0.09236	
49 Cq-CCF11	0.12444	0.12444	0.14479	0.14700	0.09439	0.09865	0.09656	
50 Cq-CCF14	0.13096	0.13096	0.15377	0.15601	0.10280	0.10710	0.10070	
51 Cq-CCF20	0.13321	0.13321	0.14935	0.15604	0.10283	0.10712	0.10501	
52 Cq-CCB01	0.12444	0.12444	0.14479	0.14700	0.09439	0.09865	0.09656	
53 Cq-CCB02	0.12660	0.12660	0.14700	0.14922	0.09648	0.10074	0.09865	
	8	9	10	11	12	13	14	
8 Cx. corniger CH2	-							
9 Cx. corniger CH3	0.03021	-						
10 Cx. corniger CH4	0.03995	0.04583	-					
11 Cq-CPE 2	0.12455	0.09879	0.12906	-				
12 Cq-CPE 8	0.12895	0.10303	0.13348	0.00370	-			
13 Cq-CPE 9	0.12455	0.09879	0.12906	0.00000	0.00370	-		
14 Cq-CCCT41	0.12444	0.10083	0.13124	0.00556	0.00928	0.00556	-	
15 Cq-CCCT44	0.12455	0.09879	0.12906	0.00000	0.00370	0.00000	0.00556	
16 Cq-CCCT46	0.12240	0.09874	0.12904	0.00370	0.00742	0.00370	0.00556	
17 Cq-CCCT37	0.12025	0.09877	0.13124	0.01303	0.01679	0.01303	0.01116	

18	Cq-CCPM10	0.14461	0.12244	0.15155	0.02438	0.02820	0.02438	0.03012
19	Cq-CCPM31	0.12676	0.10091	0.13123	0.00557	0.00930	0.00557	0.01116
20	Cq-CCPM38	0.12895	0.10737	0.13796	0.00742	0.01116	0.00742	0.01303
21	Cq-CCPM07	0.12455	0.09879	0.12906	0.00000	0.00370	0.00000	0.00556
22	Cq-CCPM34	0.12891	0.10300	0.13129	0.00370	0.00370	0.00370	0.00928
23	Cq-CCPM36	0.12225	0.10086	0.13120	0.00370	0.00742	0.00370	0.00928
24	Cq-CCPM13	0.12672	0.10088	0.13126	0.00185	0.00185	0.00185	0.00742
25	Cq-CCPM30	0.13550	0.12451	0.15599	0.02820	0.03204	0.02820	0.02820
26	Cq-CCPM29	0.13773	0.11810	0.14923	0.01679	0.01680	0.01679	0.02248
27	Cq-CCPM05	0.14218	0.12675	0.15612	0.03012	0.03204	0.03012	0.03591
28	Cq-CCM07	0.12672	0.10088	0.13126	0.00185	0.00185	0.00185	0.00742
29	Cq-CCM13	0.13349	0.11603	0.14710	0.01491	0.01869	0.01491	0.02058
30	Cq-CCH61	0.12455	0.09879	0.12906	0.00000	0.00370	0.00000	0.00556
31	Cq-CCH45	0.12897	0.10306	0.13352	0.00370	0.00742	0.00370	0.00928
32	Cq-CCH44	0.12462	0.10301	0.13566	0.01679	0.02058	0.01679	0.01869
33	Cq-CCH43	0.12238	0.10088	0.13125	0.00185	0.00556	0.00185	0.00742
34	Cq-CCH62	0.12455	0.09879	0.12906	0.00000	0.00370	0.00000	0.00556
35	Cq-CCGS02	0.12455	0.09879	0.12906	0.00000	0.00370	0.00000	0.00556
36	Cq-CCGS01	0.12895	0.10303	0.13348	0.00370	0.00000	0.00370	0.00928
37	Cq-CCGS08	0.12678	0.10094	0.13574	0.00557	0.00556	0.00557	0.01116
38	Cq-CCGS05	0.12678	0.10094	0.13128	0.00185	0.00185	0.00185	0.00742
39	Cq-CCGS03	0.12672	0.10088	0.13126	0.00185	0.00185	0.00185	0.00742
40	Cq-CCG02	0.12455	0.09879	0.12906	0.00000	0.00370	0.00000	0.00556
41	Cq-CCG11	0.12025	0.09459	0.12686	0.00929	0.01303	0.00929	0.01116
42	Cq-CCG06	0.12672	0.10088	0.13125	0.00185	0.00556	0.00185	0.00742
43	Cq-CCG14	0.12672	0.10088	0.13126	0.00185	0.00185	0.00185	0.00742
44	Cq-CCG10	0.12897	0.10306	0.13130	0.00370	0.00742	0.00370	0.00928
45	Cq-CCG03	0.12455	0.09879	0.12906	0.00370	0.00742	0.00370	0.00929
46	Cq-CCG07	0.12888	0.10298	0.13345	0.00370	0.00742	0.00370	0.00928
47	Cq-CCG04	0.12663	0.10081	0.13340	0.00742	0.01116	0.00742	0.01303
48	Cq-CCF04	0.12455	0.09879	0.13350	0.00370	0.00370	0.00370	0.00929
49	Cq-CCF11	0.12895	0.10303	0.13348	0.00370	0.00000	0.00370	0.00928
50	Cq-CCF14	0.13324	0.10719	0.14235	0.01115	0.00742	0.01115	0.01679
51	Cq-CCF20	0.13337	0.11156	0.14241	0.01115	0.00742	0.01115	0.01679
52	Cq-CCB01	0.12895	0.10303	0.13348	0.00370	0.00000	0.00370	0.00928
53	Cq-CCB02	0.13112	0.10514	0.13568	0.00556	0.00185	0.00556	0.01115

		15	16	17	18	19	20	21
15	Cq-CCCT44	-						
16	Cq-CCCT46	0.00370	-					
17	Cq-CCCT37	0.01303	0.01303	-				
18	Cq-CCPM10	0.02438	0.02820	0.03784	-			
19	Cq-CCPM31	0.00557	0.00930	0.01870	0.03012	-		
20	Cq-CCPM38	0.00742	0.01116	0.02059	0.02820	0.01306	-	
21	Cq-CCPM07	0.00000	0.00370	0.01303	0.02438	0.00557	0.00742	-
22	Cq-CCPM34	0.00370	0.00742	0.01679	0.02438	0.00929	0.01116	0.00370
23	Cq-CCPM36	0.00370	0.00742	0.01679	0.02820	0.00742	0.00742	0.00370
24	Cq-CCPM13	0.00185	0.00556	0.01491	0.02629	0.00742	0.00929	0.00185
25	Cq-CCPM30	0.02820	0.02629	0.03399	0.04369	0.03012	0.03012	0.02820
26	Cq-CCPM29	0.01679	0.02058	0.03012	0.02629	0.02250	0.01679	0.01679
27	Cq-CCPM05	0.03012	0.03397	0.04368	0.01303	0.03590	0.03013	0.03012
28	Cq-CCM07	0.00185	0.00556	0.01491	0.02629	0.00742	0.00929	0.00185
29	Cq-CCM13	0.01491	0.01869	0.02821	0.02058	0.02060	0.01303	0.01491
30	Cq-CCH61	0.00000	0.00370	0.01303	0.02438	0.00557	0.00742	0.00000
31	Cq-CCH45	0.00370	0.00742	0.01679	0.02820	0.00556	0.01116	0.00370
32	Cq-CCH44	0.01679	0.01680	0.00742	0.04173	0.01869	0.02440	0.01679
33	Cq-CCH43	0.00185	0.00556	0.01491	0.02629	0.00742	0.00929	0.00185
34	Cq-CCH62	0.00000	0.00370	0.01303	0.02438	0.00557	0.00742	0.00000
35	Cq-CCGS02	0.00000	0.00370	0.01303	0.02438	0.00557	0.00742	0.00000
36	Cq-CCGS01	0.00370	0.00742	0.01679	0.02820	0.00930	0.01116	0.00370
37	Cq-CCGS08	0.00557	0.00930	0.01870	0.03012	0.00744	0.01306	0.00557
38	Cq-CCGS05	0.00185	0.00556	0.01491	0.02629	0.00744	0.00930	0.00185
39	Cq-CCGS03	0.00185	0.00556	0.01491	0.02629	0.00742	0.00929	0.00185
40	Cq-CCG02	0.00000	0.00370	0.01303	0.02438	0.00557	0.00742	0.00000
41	Cq-CCG11	0.00929	0.01303	0.00370	0.03397	0.01494	0.01682	0.00929
42	Cq-CCG06	0.00185	0.00556	0.01491	0.02629	0.00742	0.00929	0.00185
43	Cq-CCG14	0.00185	0.00556	0.01491	0.02629	0.00742	0.00929	0.00185
44	Cq-CCG10	0.00370	0.00742	0.01679	0.02438	0.00556	0.01116	0.00370
45	Cq-CCG03	0.00370	0.00742	0.01680	0.02820	0.00557	0.01118	0.00370
46	Cq-CCG07	0.00370	0.00742	0.01679	0.02820	0.00929	0.01116	0.00370
47	Cq-CCG04	0.00742	0.01116	0.02058	0.03204	0.00556	0.01492	0.00742
48	Cq-CCF04	0.00370	0.00742	0.01680	0.02820	0.00931	0.01118	0.00370
49	Cq-CCF11	0.00370	0.00742	0.01679	0.02820	0.00930	0.01116	0.00370
50	Cq-CCF14	0.01115	0.01491	0.02438	0.03590	0.01680	0.01492	0.01115
51	Cq-CCF20	0.01115	0.01491	0.02438	0.03205	0.01491	0.01682	0.01115
52	Cq-CCB01	0.00370	0.00742	0.01679	0.02820	0.00930	0.01116	0.00370

53 Cq-CCB02	0.00556	0.00928	0.01868	0.03012	0.01116	0.01303	0.00556
	22	23	24	25	26	27	28
22 Cq-CCPM34	-						
23 Cq-CCPM36	0.00742	-					
24 Cq-CCPM13	0.00185	0.00556	-				
25 Cq-CCPM30	0.03204	0.02629	0.03012	-			
26 Cq-CCPM29	0.01679	0.01679	0.01491	0.03784	-		
27 Cq-CCPM05	0.02820	0.03013	0.03012	0.04564	0.02822	-	
28 Cq-CCM07	0.00185	0.00556	0.00000	0.03012	0.01491	0.03012	-
29 Cq-CCM13	0.01868	0.01491	0.01679	0.02820	0.01116	0.02252	0.01679
30 Cq-CCH61	0.00370	0.00370	0.00185	0.02820	0.01679	0.03012	0.00185
31 Cq-CCH45	0.00742	0.00742	0.00556	0.03204	0.02058	0.03397	0.00556
32 Cq-CCH44	0.02058	0.02058	0.01868	0.03979	0.03207	0.04761	0.01868
33 Cq-CCH43	0.00556	0.00556	0.00370	0.03012	0.01868	0.03205	0.00370
34 Cq-CCH62	0.00370	0.00370	0.00185	0.02820	0.01679	0.03012	0.00185
35 Cq-CCGS02	0.00370	0.00370	0.00185	0.02820	0.01679	0.03012	0.00185
36 Cq-CCGS01	0.00370	0.00742	0.00185	0.03204	0.01680	0.03204	0.00185
37 Cq-CCGS08	0.00929	0.00930	0.00742	0.03399	0.02250	0.03590	0.00742
38 Cq-CCGS05	0.00556	0.00556	0.00370	0.03012	0.01869	0.03204	0.00370
39 Cq-CCGS03	0.00185	0.00556	0.00000	0.03012	0.01491	0.03012	0.00000
40 Cq-CCG02	0.00370	0.00370	0.00185	0.02820	0.01679	0.03012	0.00185
41 Cq-CCG11	0.01303	0.01303	0.01116	0.03399	0.02630	0.03978	0.01116
42 Cq-CCG06	0.00556	0.00556	0.00370	0.03012	0.01868	0.03205	0.00370
43 Cq-CCG14	0.00185	0.00556	0.00000	0.03012	0.01491	0.03012	0.00000
44 Cq-CCG10	0.00370	0.00742	0.00556	0.03204	0.02058	0.03012	0.00556
45 Cq-CCG03	0.00742	0.00556	0.00556	0.02820	0.02059	0.03397	0.00556
46 Cq-CCG07	0.00742	0.00742	0.00556	0.03204	0.02058	0.03398	0.00556
47 Cq-CCG04	0.01115	0.00928	0.00928	0.03204	0.02438	0.03784	0.00928
48 Cq-CCF04	0.00742	0.00742	0.00556	0.03206	0.02059	0.03397	0.00556
49 Cq-CCF11	0.00370	0.00742	0.00185	0.03204	0.01680	0.03204	0.00185
50 Cq-CCF14	0.01115	0.01491	0.00928	0.03978	0.02438	0.03978	0.00928
51 Cq-CCF20	0.01115	0.01491	0.00928	0.03978	0.02438	0.03978	0.00928
52 Cq-CCB01	0.00370	0.00742	0.00185	0.03204	0.01680	0.03204	0.00185
53 Cq-CCB02	0.00556	0.00928	0.00370	0.03397	0.01869	0.03397	0.00370
	29	30	31	32	33	34	35
29 Cq-CCM13	-						
30 Cq-CCH61	0.01491	-					
31 Cq-CCH45	0.01869	0.00370	-				
32 Cq-CCH44	0.03015	0.01679	0.01679	-			
33 Cq-CCH43	0.01679	0.00185	0.00556	0.01868	-		
34 Cq-CCH62	0.01491	0.00000	0.00370	0.01679	0.00185	-	
35 Cq-CCGS02	0.01491	0.00000	0.00370	0.01679	0.00185	0.00000	-
36 Cq-CCGS01	0.01869	0.00370	0.00742	0.02058	0.00556	0.00370	0.00370
37 Cq-CCGS08	0.02060	0.00557	0.00556	0.01869	0.00742	0.00557	0.00557
38 Cq-CCGS05	0.01680	0.00185	0.00556	0.01869	0.00370	0.00185	0.00185
39 Cq-CCGS03	0.01679	0.00185	0.00556	0.01868	0.00370	0.00185	0.00185
40 Cq-CCG02	0.01491	0.00000	0.00370	0.01679	0.00185	0.00000	0.00000
41 Cq-CCG11	0.02440	0.00929	0.01303	0.01116	0.01116	0.00929	0.00929
42 Cq-CCG06	0.01679	0.00185	0.00556	0.01868	0.00370	0.00185	0.00185
43 Cq-CCG14	0.01679	0.00185	0.00556	0.01868	0.00370	0.00185	0.00185
44 Cq-CCG10	0.01869	0.00370	0.00370	0.01679	0.00556	0.00370	0.00370
45 Cq-CCG03	0.01870	0.00370	0.00742	0.02059	0.00556	0.00370	0.00370
46 Cq-CCG07	0.01868	0.00370	0.00742	0.02058	0.00556	0.00370	0.00370
47 Cq-CCG04	0.02248	0.00742	0.00742	0.02058	0.00928	0.00742	0.00742
48 Cq-CCF04	0.01870	0.00370	0.00742	0.02059	0.00556	0.00370	0.00370
49 Cq-CCF11	0.01869	0.00370	0.00742	0.02058	0.00556	0.00370	0.00370
50 Cq-CCF14	0.02629	0.01115	0.01491	0.02820	0.01303	0.01115	0.01115
51 Cq-CCF20	0.02629	0.01115	0.01303	0.02629	0.00928	0.01115	0.01115
52 Cq-CCB01	0.01869	0.00370	0.00742	0.02058	0.00556	0.00370	0.00370
53 Cq-CCB02	0.02058	0.00556	0.00928	0.02248	0.00742	0.00556	0.00556
	36	37	38	39	40	41	42
36 Cq-CCGS01	-						
37 Cq-CCGS08	0.00556	-					
38 Cq-CCGS05	0.00185	0.00370	-				
39 Cq-CCGS03	0.00185	0.00742	0.00370	-			
40 Cq-CCG02	0.00370	0.00557	0.00185	0.00185	-		
41 Cq-CCG11	0.01303	0.01494	0.01116	0.01116	0.00929	-	
42 Cq-CCG06	0.00556	0.00742	0.00370	0.00370	0.00185	0.01116	-
43 Cq-CCG14	0.00185	0.00742	0.00370	0.00000	0.00185	0.01116	0.00370

44 Cq-CCG10	0.00742	0.00556	0.00556	0.00556	0.00370	0.01303	0.00556
45 Cq-CCG03	0.00742	0.00931	0.00557	0.00556	0.00370	0.01305	0.00556
46 Cq-CCG07	0.00742	0.00929	0.00556	0.00556	0.00370	0.01303	0.00185
47 Cq-CCG04	0.01116	0.00742	0.00929	0.00928	0.00742	0.01680	0.00928
48 Cq-CCF04	0.00370	0.00185	0.00185	0.00556	0.00370	0.01305	0.00556
49 Cq-CCF11	0.00000	0.00556	0.00185	0.00185	0.00370	0.01303	0.00556
50 Cq-CCF14	0.00742	0.00928	0.00928	0.00928	0.01115	0.02058	0.01303
51 Cq-CCF20	0.00742	0.01115	0.00928	0.00928	0.01115	0.02058	0.01303
52 Cq-CCB01	0.00000	0.00556	0.00185	0.00185	0.00370	0.01303	0.00556
53 Cq-CCB02	0.00185	0.00742	0.00370	0.00370	0.00556	0.01491	0.00742

	43	44	45	46	47	48	49
43 Cq-CCG14	-						
44 Cq-CCG10	0.00556	-					
45 Cq-CCG03	0.00556	0.00742	-				
46 Cq-CCG07	0.00556	0.00742	0.00742	-			
47 Cq-CCG04	0.00928	0.00742	0.00742	0.01115	-		
48 Cq-CCF04	0.00556	0.00742	0.00744	0.00742	0.00929	-	
49 Cq-CCF11	0.00185	0.00742	0.00742	0.00742	0.01116	0.00370	-
50 Cq-CCF14	0.00928	0.01491	0.01491	0.01491	0.01679	0.00742	0.00742
51 Cq-CCF20	0.00928	0.01303	0.01491	0.01491	0.01679	0.01115	0.00742
52 Cq-CCB01	0.00185	0.00742	0.00742	0.00742	0.01116	0.00370	0.00000
53 Cq-CCB02	0.00370	0.00928	0.00929	0.00928	0.01303	0.00556	0.00185

	50	51	52	53
50 Cq-CCF14	-			
51 Cq-CCF20	0.01303	-		
52 Cq-CCB01	0.00742	0.00742	-	
53 Cq-CCB02	0.00928	0.00928	0.00185	-

**Apéndice 2.** Matriz de distancias pareadas (divergencia) por Kimura- 2 – parámetros, utilizando máxima parsimonia (Especies de *Culex quinquefasciatus* de diferente localidades estudiadas incluyendo los grupos externo, *Aedes aegypti* y *albopictus* y *Culex corniger*). Gen ND5.

	1	2	3	4	5	6	7	
1 Aeaegyp-PE10	-							
2 Aeaegyp-PE11	0.00236	-						
3 ABealbo-PE01	0.10602	0.10876	-					
4 Aealbo-PE02	0.10061	0.10332	0.00472	-				
5 Cx corniger-CH11	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	-			
6 Cx corniger-CH17	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	0.00000	-		
7 Cx corniger-CH18	0.12269	0.11987	0.11980	0.11428	0.00948	0.00948	-	
8 Cx corniger-CH60	0.11434	0.11714	0.11151	0.10606	0.00236	0.00236	0.01188	-
9 8ND5	0.10617	0.10893	0.10611	0.10069	0.02885	0.02885	0.03877	
10 5ND5	0.10617	0.10893	0.11151	0.10606	0.03374	0.03374	0.04371	
11 Cq-CGS02	0.10337	0.10611	0.10342	0.09802	0.01667	0.01667	0.02639	
12 Cq-CGS01	0.11975	0.12255	0.11701	0.11151	0.01426	0.01426	0.02394	
13 Cq-CGS10	0.11428	0.11707	0.11147	0.10602	0.00236	0.00236	0.01187	
14 Cq-CGS04	0.11428	0.11707	0.11157	0.10611	0.00948	0.00948	0.01427	
15 Cq-CGS08	0.11434	0.11714	0.11151	0.10606	0.01187	0.01187	0.02152	
16 Cq-CGS05	0.11434	0.11714	0.11151	0.10606	0.00236	0.00236	0.01188	
17 Cq-CH43	0.09527	0.09797	0.10064	0.09527	0.06387	0.06387	0.07426	
18 Cq-CH45	0.09527	0.09797	0.10337	0.09797	0.06387	0.06387	0.07426	
19 Cq-CH62	0.11434	0.11714	0.11151	0.10606	0.00236	0.00236	0.01188	
20 Cq-CH19	0.12269	0.11987	0.11980	0.11428	0.00948	0.00948	0.00000	
21 Cq-CPM08	0.10606	0.10880	0.10611	0.10069	0.01427	0.01427	0.02397	
22 Cq-CPM09	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	0.00000	0.00000	0.00948	
23 Cq-CPM05	0.11423	0.11701	0.11419	0.10872	0.00472	0.00472	0.01426	
24 Cq-CPM36	0.10606	0.10880	0.10064	0.09527	0.01427	0.01427	0.02397	
25 Cq-CPM37	0.11151	0.11428	0.10880	0.10337	0.00236	0.00236	0.01187	
26 Cq-CPM31	0.10606	0.10880	0.10611	0.10069	0.01427	0.01427	0.02397	
27 Cq-CPM03	0.15077	0.15369	0.15072	0.14497	0.03863	0.03863	0.04863	
28 Cq-CM07	0.09802	0.10074	0.10880	0.10337	0.01665	0.01665	0.02635	
29 Cq-CM04	0.11434	0.11714	0.11151	0.10606	0.00236	0.00236	0.01188	
30 Cq-CM01	0.10599	0.10872	0.11144	0.10599	0.04360	0.04360	0.05365	
31 Cq-CM13	0.11987	0.12269	0.11701	0.11151	0.00710	0.00710	0.00709	
32 Cq-CM14	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	0.00000	0.00000	0.00948	
33 Cq-CM08	0.11428	0.11707	0.11147	0.10602	0.00236	0.00236	0.01187	
34 Cq-CG02	0.09527	0.09797	0.10064	0.09527	0.05879	0.05879	0.06912	
35 Cq-CG11	0.09527	0.09797	0.10064	0.09527	0.06387	0.06387	0.07426	
36 Cq-CG10	0.11428	0.11707	0.10606	0.10602	0.00236	0.00236	0.01187	
37 Cq-CF04	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	0.00000	0.00000	0.00948	
38 Cq-CF11	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	0.00472	0.00472	0.01186	
39 Cq-CF09	0.11434	0.11714	0.11151	0.10606	0.00236	0.00236	0.01188	
40 Cq-CF07	0.11987	0.12269	0.11701	0.11151	0.00710	0.00710	0.00709	
41 Cq-CB01	0.12246	0.11967	0.12803	0.12246	0.08726	0.08726	0.08724	
42 Cq-CB03	0.09527	0.09797	0.10064	0.09527	0.06387	0.06387	0.07426	
43 Cq-CB14	0.13365	0.13650	0.14210	0.13642	0.10064	0.10064	0.11157	
44 Cq-CB05	0.09793	0.10064	0.10332	0.09793	0.06643	0.06643	0.07685	
45 Cq-CCT41	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	0.00000	0.00000	0.00948	
46 CqCCT37	0.09793	0.10064	0.10332	0.09793	0.06643	0.06643	0.07685	
47 Cq-CCT31	0.09527	0.09797	0.10064	0.09527	0.06387	0.06387	0.07426	
48 Cq-CCT28	0.11428	0.11707	0.11147	0.10602	0.00236	0.00236	0.01187	
49 Cq-CCT39	0.11157	0.11434	0.10876	0.10332	0.00472	0.00472	0.01186	
50 Cq-CCT21	0.09793	0.10064	0.10332	0.09793	0.06902	0.06902	0.07949	
	8	9	10	11	12	13	14	
8 Cx corniger-CH60	-							
9 8ND5	0.03133	-						
10 5ND5	0.03622	0.00472	-					
11 Cq-CGS02	0.01909	0.01188	0.01667	-				
12 Cq-CGS01	0.01186	0.03377	0.03869	0.02150	-			
13 Cq-CGS10	0.00472	0.03129	0.03619	0.01907	0.01666	-		
14 Cq-CGS04	0.00710	0.02889	0.03377	0.01668	0.01427	0.01187	-	
15 Cq-CGS08	0.00947	0.03133	0.03622	0.01909	0.01186	0.01426	0.01667	
16 Cq-CGS05	0.00000	0.03133	0.03622	0.01909	0.01186	0.00472	0.00710	
17 Cq-CH43	0.06646	0.03369	0.02878	0.04611	0.06902	0.06643	0.06391	
18 Cq-CH45	0.06646	0.04361	0.03866	0.04611	0.06902	0.06643	0.06391	
19 Cq-CH62	0.00000	0.031+33	0.03622	0.01909	0.01186	0.00472	0.00710	
20 Cq-CH19	0.01188	0.03877	0.04371	0.02639	0.02394	0.01187	0.01427	
21 Cq-CPM08	0.01668	0.01427	0.01907	0.00710	0.01909	0.01667	0.01915	
22 Cq-CPM09	0.00236	0.02885	0.03374	0.01667	0.01426	0.00236	0.00948	
23 Cq-CPM05	0.00709	0.03374	0.03866	0.02149	0.01906	0.00710	0.01426	



24	Cq-CPM36	0.01668	0.01427	0.01907	0.00710	0.01909	0.01667	0.01429
25	Cq-CPM37	0.00472	0.02642	0.03129	0.01427	0.01187	0.00472	0.00711
26	Cq-CPM31	0.01668	0.01427	0.01907	0.00236	0.01909	0.01667	0.01429
27	Cq-CPM03	0.04111	0.06646	0.07160	0.05365	0.05112	0.04111	0.04611
28	Cq-CM07	0.01906	0.02636	0.02636	0.01425	0.02148	0.01907	0.02150
29	Cq-CM04	0.00473	0.03133	0.03622	0.01909	0.01667	0.00472	0.01188
30	Cq-CM01	0.04610	0.03863	0.03369	0.03125	0.04860	0.04609	0.04360
31	Cq-CM13	0.00948	0.03626	0.04119	0.02394	0.02150	0.00947	0.01187
32	Cq-CM14	0.00236	0.02885	0.03374	0.01667	0.01426	0.00236	0.00948
33	Cq-CM08	0.00472	0.03129	0.03619	0.01907	0.01666	0.00472	0.01187
34	Cq-CG02	0.06136	0.02878	0.02391	0.04113	0.06391	0.06132	0.05883
35	Cq-CG11	0.06646	0.03369	0.02878	0.04611	0.06902	0.06643	0.06391
36	Cq-CG10	0.00472	0.03129	0.03619	0.01907	0.01666	0.00472	0.01187
37	Cq-CF04	0.00236	0.02885	0.03374	0.01667	0.01426	0.00236	0.00948
38	Cq-CF11	0.00709	0.03374	0.03866	0.02149	0.01906	0.00710	0.01186
39	Cq-CF09	0.00473	0.03133	0.03622	0.01909	0.01667	0.00472	0.01188
40	Cq-CF07	0.00948	0.03626	0.04119	0.02394	0.02150	0.00947	0.01187
41	Cq-CB01	0.08993	0.05871	0.05364	0.07155	0.09258	0.08990	0.08463
42	Cq-CB03	0.06646	0.03369	0.02878	0.04611	0.06902	0.06643	0.06391
43	Cq-CB14	0.10337	0.07935	0.07414	0.09258	0.10880	0.10332	0.10617
44	Cq-CB05	0.06902	0.03616	0.03123	0.04861	0.07160	0.06899	0.06646
45	Cq-CCT41	0.00236	0.02885	0.03374	0.01667	0.01426	0.00236	0.00948
46	CqCCT37	0.06902	0.03616	0.03123	0.04861	0.07160	0.06899	0.06646
47	Cq-CCT31	0.06646	0.03369	0.02878	0.04611	0.06902	0.06643	0.06391
48	Cq-CCT28	0.00472	0.03129	0.03619	0.01907	0.01666	0.00472	0.01187
49	Cq-CCT39	0.00709	0.03374	0.03866	0.02149	0.01906	0.00710	0.01186
50	Cq-CCT21	0.07164	0.03863	0.03369	0.05113	0.07421	0.07160	0.06907

		15	16	17	18	19	20	21
15	Cq-CGS08	-	-	-	-	-	-	-
16	Cq-CGS05	0.00947	-	-	-	-	-	-
17	Cq-CH43	0.06646	0.06646	-	-	-	-	-
18	Cq-CH45	0.06646	0.06646	0.00950	-	-	-	-
19	Cq-CH62	0.00947	0.00000	0.06646	0.06646	-	-	-
20	Cq-CH19	0.02152	0.01188	0.07426	0.07426	0.01188	-	-
21	Cq-CPM08	0.01668	0.01668	0.04861	0.04861	0.01668	0.02397	-
22	Cq-CPM09	0.01187	0.00236	0.06387	0.06387	0.00236	0.00948	0.01427
23	Cq-CPM05	0.01666	0.00709	0.06899	0.06899	0.00709	0.01426	0.01907
24	Cq-CPM36	0.01668	0.01668	0.04861	0.05367	0.01668	0.02397	0.00950
25	Cq-CPM37	0.01426	0.00472	0.06132	0.06132	0.00472	0.01187	0.01188
26	Cq-CPM31	0.01668	0.01668	0.04861	0.04861	0.01668	0.02397	0.00473
27	Cq-CPM03	0.05113	0.04111	0.10332	0.10332	0.04111	0.04863	0.05113
28	Cq-CM07	0.01906	0.01906	0.04616	0.04616	0.01906	0.02635	0.01186
29	Cq-CM04	0.01427	0.00473	0.06646	0.06646	0.00473	0.01188	0.01668
30	Cq-CM01	0.04610	0.04610	0.03369	0.03369	0.04610	0.05365	0.03369
31	Cq-CM13	0.01909	0.00948	0.07164	0.07164	0.00948	0.00709	0.02152
32	Cq-CM14	0.01187	0.00236	0.06387	0.06387	0.00236	0.00948	0.01427
33	Cq-CM08	0.01426	0.00472	0.06643	0.06643	0.00472	0.01187	0.01667
34	Cq-CG02	0.06136	0.06136	0.00472	0.01427	0.06136	0.06912	0.04361
35	Cq-CG11	0.06646	0.06646	0.00000	0.00950	0.06646	0.07426	0.04861
36	Cq-CG10	0.01426	0.00472	0.06643	0.06643	0.00472	0.01187	0.01667
37	Cq-CF04	0.01187	0.00236	0.06387	0.06387	0.00236	0.00948	0.01427
38	Cq-CF11	0.01666	0.00709	0.06387	0.06387	0.00709	0.01186	0.01907
39	Cq-CF09	0.01427	0.00473	0.06646	0.06646	0.00473	0.01188	0.01668
40	Cq-CF07	0.01909	0.00948	0.07164	0.07164	0.00948	0.00709	0.02152
41	Cq-CB01	0.08993	0.08993	0.02391	0.03371	0.08993	0.08724	0.07154
42	Cq-CB03	0.06646	0.06646	0.00000	0.00950	0.06646	0.07426	0.04861
43	Cq-CB14	0.10876	0.10337	0.04360	0.05370	0.10337	0.11157	0.08989
44	Cq-CB05	0.06902	0.06902	0.00236	0.01188	0.06902	0.07685	0.05112
45	Cq-CCT41	0.01187	0.00236	0.06387	0.06387	0.00236	0.00948	0.01427
46	CqCCT37	0.06902	0.06902	0.00236	0.01188	0.06902	0.07685	0.05112
47	Cq-CCT31	0.06646	0.06646	0.00000	0.00950	0.06646	0.07426	0.04861
48	Cq-CCT28	0.01426	0.00472	0.06643	0.06643	0.00472	0.01187	0.01667
49	Cq-CCT39	0.01666	0.00709	0.06387	0.06387	0.00709	0.01186	0.01907
50	Cq-CCT21	0.07164	0.07164	0.00472	0.01429	0.07164	0.07949	0.05365

		22	23	24	25	26	27	28
22	Cq-CPM09	-	-	-	-	-	-	-
23	Cq-CPM05	0.00472	-	-	-	-	-	-
24	Cq-CPM36	0.01427	0.01907	-	-	-	-	-
25	Cq-CPM37	0.00236	0.00710	0.01188	-	-	-	-
26	Cq-CPM31	0.01427	0.01907	0.00473	0.01188	-	-	-
27	Cq-CPM03	0.03863	0.04360	0.05113	0.03863	0.05113	-	-
28	Cq-CM07	0.01665	0.02149	0.01186	0.01425	0.01186	0.05364	-
29	Cq-CM04	0.00236	0.00709	0.01668	0.00472	0.01668	0.04111	0.01906

30	Cq-CM01	0.04360	0.04860	0.03369	0.04111	0.02880	0.08197	0.03123
31	Cq-CM13	0.00710	0.01186	0.02152	0.00947	0.02152	0.04611	0.02391
32	Cq-CM14	0.00000	0.00472	0.01427	0.00236	0.01427	0.03863	0.01665
33	Cq-CM08	0.00236	0.00710	0.01667	0.00472	0.01667	0.04111	0.01907
34	Cq-CG02	0.05879	0.06387	0.04361	0.05626	0.04361	0.09797	0.04616
35	Cq-CG11	0.06387	0.06899	0.04861	0.06132	0.04861	0.10332	0.04616
36	Cq-CG10	0.00236	0.00710	0.01667	0.00472	0.01667	0.04111	0.01907
37	Cq-CF04	0.00000	0.00472	0.01427	0.00236	0.01427	0.03863	0.01665
38	Cq-CF11	0.00472	0.00948	0.01907	0.00710	0.01907	0.04360	0.01665
39	Cq-CF09	0.00236	0.00709	0.01668	0.00472	0.01668	0.04111	0.01906
40	Cq-CF07	0.00710	0.01186	0.02152	0.00947	0.02152	0.04611	0.02391
41	Cq-CB01	0.08726	0.09255	0.07414	0.08463	0.07414	0.12241	0.06899
42	Cq-CB03	0.06387	0.06899	0.04861	0.06132	0.04861	0.10332	0.04616
43	Cq-CB14	0.10064	0.10602	0.09524	0.09797	0.09524	0.11696	0.08729
44	Cq-CB05	0.06643	0.07157	0.05112	0.06387	0.05112	0.10602	0.04865
45	Cq-CCT41	0.00000	0.00472	0.01427	0.00236	0.01427	0.03863	0.01665
46	CqCCT37	0.06643	0.07157	0.05112	0.06387	0.05112	0.10602	0.04865
47	Cq-CCT31	0.06387	0.06899	0.04861	0.06132	0.04861	0.10332	0.04616
48	Cq-CCT28	0.00236	0.00710	0.01667	0.00472	0.01667	0.04111	0.01907
49	Cq-CCT39	0.00472	0.00948	0.01907	0.00710	0.01907	0.04360	0.01665
50	Cq-CCT21	0.06902	0.07418	0.05365	0.06646	0.05365	0.10876	0.05119

		29	30	31	32	33	34	35
29	Cq-CM04	-						
30	Cq-CM01	0.04610	-					
31	Cq-CM13	0.00948	0.05112	-				
32	Cq-CM14	0.00236	0.04360	0.00710	-			
33	Cq-CM08	0.00472	0.04609	0.00947	0.00236	-		
34	Cq-CG02	0.06136	0.03369	0.06651	0.05879	0.06132	-	
35	Cq-CG11	0.06646	0.03369	0.07164	0.06387	0.06643	0.00472	-
36	Cq-CG10	0.00472	0.04609	0.00947	0.00236	0.00472	0.06132	0.06643
37	Cq-CF04	0.00236	0.04360	0.00710	0.00000	0.00236	0.05879	0.06387
38	Cq-CF11	0.00709	0.04360	0.00947	0.00472	0.00710	0.05879	0.06387
39	Cq-CF09	0.00473	0.04610	0.00948	0.00236	0.00472	0.06136	0.06646
40	Cq-CF07	0.00948	0.05112	0.00000	0.00710	0.00947	0.06651	0.07164
41	Cq-CB01	0.08993	0.05871	0.08724	0.08726	0.08990	0.02878	0.02391
42	Cq-CB03	0.06646	0.03369	0.07164	0.06387	0.06643	0.00472	0.00000
43	Cq-CB14	0.10337	0.07938	0.10880	0.10064	0.10332	0.04860	0.04360
44	Cq-CB05	0.06902	0.03616	0.07421	0.06643	0.06899	0.00710	0.00236
45	Cq-CCT41	0.00236	0.04360	0.00710	0.00000	0.00236	0.05879	0.06387
46	CqCCT37	0.06902	0.03616	0.07421	0.06643	0.06899	0.00710	0.00236
47	Cq-CCT31	0.06646	0.03369	0.07164	0.06387	0.06643	0.00472	0.00000
48	Cq-CCT28	0.00472	0.04609	0.00947	0.00236	0.00472	0.06132	0.06643
49	Cq-CCT39	0.00709	0.04360	0.00947	0.00472	0.00710	0.05879	0.06387
50	Cq-CCT21	0.07164	0.03864	0.07685	0.06902	0.07160	0.00947	0.00472

		36	37	38	39	40	41	42
36	Cq-CG10	-						
37	Cq-CF04	0.00236	-					
38	Cq-CF11	0.00710	0.00472	-				
39	Cq-CF09	0.00472	0.00236	0.00709	-			
40	Cq-CF07	0.00947	0.00710	0.00947	0.00948	-		
41	Cq-CB01	0.08990	0.08726	0.08461	0.08993	0.08724	-	
42	Cq-CB03	0.06643	0.06387	0.06387	0.06646	0.07164	0.02391	-
43	Cq-CB14	0.10332	0.10064	0.10064	0.10337	0.10880	0.06127	0.04360
44	Cq-CB05	0.06899	0.06643	0.06643	0.06902	0.07421	0.02634	0.00236
45	Cq-CCT41	0.00236	0.00000	0.00472	0.00236	0.00710	0.08726	0.06387
46	CqCCT37	0.06899	0.06643	0.06643	0.06902	0.07421	0.02634	0.00236
47	Cq-CCT31	0.06643	0.06387	0.06387	0.06646	0.07164	0.02391	0.00000
48	Cq-CCT28	0.00472	0.00236	0.00710	0.00472	0.00947	0.08990	0.06643
49	Cq-CCT39	0.00710	0.00472	0.00000	0.00709	0.00947	0.08461	0.06387
50	Cq-CCT21	0.07160	0.06902	0.06902	0.07164	0.07685	0.02878	0.00472

		43	44	45	46	47	48	49
43	Cq-CB14	-						
44	Cq-CB05	0.04610	-					
45	Cq-CCT41	0.10064	0.06643	-				
46	CqCCT37	0.04610	0.00472	0.06643	-			
47	Cq-CCT31	0.04360	0.00236	0.06387	0.00236	-		
48	Cq-CCT28	0.10332	0.06899	0.00236	0.06899	0.06643	-	
49	Cq-CCT39	0.10064	0.06643	0.00472	0.06643	0.06387	0.00710	-
50	Cq-CCT21	0.04360	0.00709	0.06902	0.00709	0.00472	0.07160	0.06902
		50						
50	Cq-CCT21	-						

## BIBLIOGRAFÍA

- Almirón W.R, Humeres S.G, Gardenal S.N. 1995. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 90:469-73.
- Arrivillaga, J.C, Norris, D, Feliciangeli, M y Lanzaro, M. 2002. Phylogeography of the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infection, Genetics and Evolution* 2: 83-95.
- Arrivillaga, J.C., and Feliciangeli, M. 2001. *Lutzomyia pseudolongipalpis*: the first new specie within the *longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) complex from La Rinconada, Curarigua, Lara State, Venezuela. *J. Med. Entomol.* 38: 783-790.
- Avise. J.C. 1987. Identification and interpretation of mitochondrial DNA stocks in marine species. En *Pro. Stock identification workshop*. H. Kumpf y E. L. Nakamura eds. Publication of The National Oceanographic and Atmospheric Administration, Oanama City, FL. Pp. 105-136.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb. T., Niegel, J.E., Reeb, C.A y Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Avise. J.C. 1994. *Molecular Marker, natural history an evolution*. Chapman y Hall, New York.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, EUA.
- Barrera, R. 1977. Ecología de los culicinos del cementerio general del sur. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Barrera R, Machado – Allison CE y Bulla LA .1979. Densidad larval y segregación de nichos en tres Culicidae urbanos (*Culex fatigans* Wied., *C. corniger* Theo y *Aedes aegypti* L.) en el cementerio de Caracas. *Acta Científica Venezolana* 30, 418-424.
- Barrera R, Machado-Allison CE y Bulla, L. 1982. Mosquitoes and mourning in the Caracas cemetery. *Antenna* 6: 250–252.

- Behura, S.K. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*. 15, 3087-3113.
- Belkin, J. N., Schick, R. X., Galindo, P. y Aitken, T. H. G. 1965. Mosquito Studies (Diptera: Culicidae). I. A project for a systematic study of the mosquitoes of Middle America. *Contributions of the American Entomological Institute*, 1:1–17.
- Besansky, N.J y col. 1994. Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V Ol.91 pp. 6885-6888.
- Besansky, N.J., Lehmann, T., Fahey, G.T., Fontenille, D., Braack, L.E., Hawley, W.A y Collins, F.H. 1997. Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. Arabiensis*, suggest extensive flow. *Genetics* 147: 1817-1828.
- Birungi, J y Munstermann, L. 2002. Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: *Culicidae*) Populations Based on Mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95: 125-132.
- Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. En: R.J. MacIntyre (ed.). *Molecular evolutionary genetics*. Plenum, Nueva York, EUA. pp. 95-130.
- Brewer, M., Bufa, L., Almirón, W. *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Diptera: *Culicidae*) en Córdoba, Argentina. *Rev Per Entomol* 1987; 29:69-72.
- Clement, M., Posada, D and Crandall, K. 2002. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*9: 1657-1660.
- Cook, S., Diallo, M., Sall, A., Cooper, A y Holmes, E. 2005. Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* (Diptera: *Culicidae*) involved in transmission of arboviral disease in West Africa. *J. Me. Entomol.* 42: 19-28.
- Cova - García, P. Sutil E., y Rausseo. J. 1966. Mosquitos (Culicinos) de Venezuela. Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social Caracas – Venezuela.
- Cupp E., Cupp M. 1994. Salivary apyrase in African and new World vectors of *Plasmodium* species and its relationship to malaria transmisión. *American Journal Tropical Medicine and Higiene.* 50: 235-240

- Davies, R.G. 1975. Introducción a la Entomología. Séptima edición. Mundi-Prensa. Biología de poblaciones de insectos.
- De Brito, R.A., Manfrin, M.H and Sene, F.M. 2002. Nested cladistic analysis of Brazilian populations of *Drosophila serido*. Mol. Phylogenet. Evol. 22:131-143
- Del Ventura, F. 2008. Patrones de distribución, análisis geoespacial y determinación de áreas de endemismo de los mosquitos (Diptera: Culicidae) de Venezuela. Trabajo Especial de Grado, Fac. Ciencias, UCV. 62 pp. Illus.
- Donnelly, M.J, Pinto, J, Girod, R, Besansky, N.J. and Lehmann, T. 2004. Revisiting the role of introgression vs shared ancestral polymorphisms as key processes shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. *Heredity* 92, 61–68
- Dusfour, I. 2004. Molecular Evidence of Speciation Between Island and Continental Populations of *Anopheles (Cellia) sondaicus* (Diptera: *Culicidae*), a Principal Malaria Vector Taxon in Southeast Asia. *J. Med. Entomol.* 41 (3): 287-295.
- Farid, H. A., Hammad, R. E., Hassan, M. M., Morsy, Z. S., Kamal, I. H., Weil, G. J., and Ramzy, R.M.R. 2001. Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95: 29Ð32.
- Farris, J.S., Kallersjo, M., Kluge, A.G. y Bult, 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Forattini, O.P. 2000. Entomología médica. Editora da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo.
- Futuyma, D.J. 1998. Evolutionary Biology. Tercera Edición. USA.
- Hasan, A.U., Setsuo, S., Uddin, S.M., Fujimoto, C., Hurada, M., Rahman, S.M., Zaman, R.U. M Kakehi. 2009. Molecular phylogeography of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in central Bangladesh. *Acta Tropica* 112: 106-114.
- Herbeck, J.T y Novembre, J. 2003. Códon usage patterns in Cytochrome Oxidase I across multiple insect orders. *J. Mol. Evol.* 56:691-701.
- Hernández, C. 2006. “Divergencia Filogenética estimada asumiendo un reloj molecular (ADMmt) en vectores de Encefalitis Equina Venezolana: *Culex*

(*Melanoconion*) *taeniopus* y *Cx (Mel) cedecei* (Diptera: Culicidae). Trabajo Especial de Grado, Fac. Ciencias, UCV. 107 pp. Illus.

- Hillis, D.M., Mable, B.K. 1996. Applications of molecular systematics: the state of the field and look to the future. En *Molecular Systematics* (editores D. Hillis, C. Mortiz, B.K Mable), pp. 515-543. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hoy, M.A. 2003. *Insect Molecular Genetics*, 2nd edn, Academic Press/Elsevier, San Diego, California.
- Hubalek, Z., and Halouzka, J. 1999. West Nile fever: a reemerging mosquito borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 643-650.
- Hudson, R. R., Boos, D.D., and Kaplan, N.L. 1992. A statistically test for detecting geographic subdivision. *Mol. Biol. Evol.* 9:138-151.
- Huelsenbeck, J.P., Bull, J.J., Cunningham, C.W. 1996. Combining data in phylogenetic analysis. *Trends in Ecology y Evolution.* 11:152-158.
- Kambhampati, S. y Smith, P.T. (1995). PCR primer for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology* 4: 233-236.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol. Evol.* 16:111-120
- Krzywinski, J.M y Besansky, N.J. 2003. Molecular systematic of *Anopheles*: from subgenerato subpopulations. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 111-139.
- Lai, C. H., Tung, K. C., Ooi, H. K., and Wang, J. S. 2000. Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as a vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microPlarial density. *Vet. Parasitol.* 90: 231-237.
- Lanciotti, R. S., Kerst, A. J., Nasci, R. S., Godsey, M. S., Mitchell, C.J., Savage, H.M., Komar, N., Panella, N. A., Allen, B. C., Volpe, K. E., Davis, B. S., and Roehrig, J. T. 2000. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4066-4071.
- Lane, J. 1953. Neotropical *Culicidae*. *Dixinae, Chaborinae and Culicidae*, Tribu *Anophelini, Toxorhynchitinae and Culicini* (Genus *Culex* only). Publicada por the University of Sao Paulo, Brazil. 548p.

- Linton, Y.M., Samanidou- Voyadjoglou, A., Smith, L. and Harbach, R.E. 2001. New occurrence records for *Anopheles maculipennis* and *Anopheles messae* in the northern Greece based on DNA sequence data. Eur. Mosq. Bull. 11.
- Linton, Y.M., Smith, L., Koliopoulou, G., Samanidou – Voyadjoglou, A., Zouno, A.K. and Harbach, R.E. 2003. Morphological and molecular characterization of the *Anopheles (Anopheles) maculipennis*. Meigen, type species of the genus and a nominotypical member of the *Maculipennis* Complex. Syst. Entomol. 28: 39-55.
- Machado-Allison, C.E. 1982. Ecología de Mosquitos Parte III. Adultos. Acta Biologica Venezuelica. 11: 133-237.
- Miller, B.R, Crabtree, M. y Savage, H. 1996. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. Insect Molecular Biology. 5: 93-107.
- Mitchell, A., Sperling, F.A.H. and Hickey, D. 2002. Higher-level phylogeny of mosquitoes (Diptera: Culicidae): mt DNA data support a derived placement for *Toxorhynchites*. Insect Syst. Evol. 33:163-174.
- Mustermann L.E y Conn, J.E. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera: Culicidae): impact of molecular biology and cladistic analysis. Annu. Rev. Entomol. 42:351-369.
- Navarro J.C. Liria, J., Piñango, H. y Barrera, R. 2007. Biogeographic area relationships in Venezuela: A parsimony analysis of Culicidae-Phytotelmata relationships distributions in National Parks. Zootaxa. 1547: 1-19.
- Navarro J.C. y Weaver, S.C. .2004. Molecular phylogeny of the vomerifer and Pedroi Groups in the Spissipes Section of the subgenus *Culex (Melanoconion)*. J.Med.Entomol. 41:575-581.
- Navarro J.C. Hernández, C., Rangel – Diaz, G., Guerrero, E. y Rangel y Arrivillaga, J. 2009. Invalidación de autapomorfías putativas mediante análisis de filogenia molecular en *Anopheles* subgénero *Nyssorhynchus*. Boletín de malariología y salud ambiental. VOL XLIX, N°2.
- Nei, M.1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.

- Rivas F, Díaz L, Cárdenas V, Daza E, Bruzón L, Alcalá A y col. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. *J Infect Dis* 1997;175:828-32.
- Peng, Z., Yang M., Simons E. 1996. Immunologic mechanisms in mosquito allergy: correlation of skin with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens. *Annals of Allergy and Asthma Immunology*. 77: 238- 244.
- Pérez, E.E., y Molina, D. 2009. Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linneaus, 1762) (Díptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Boletín de malariología y salud ambiental* Vol. XLIX.
- Rozas, J., y Rozas, R. 1999. DNAsp version 3 an integrated program for molecular populations genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*. 15:174-175.
- Sabatinelli G, Ranieri E, Gianzi FP, Papakai M, Cancrini G. Role de *Culex quinquefasciatus* dans la transmisión de la filaríose de Bancroft dans la RépubliqueFédérale Islamique des Comores (Océan Indien). *Parasite* 1994;1:71-6.
- Salazar, M.J y Moncada, L. 2004. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: *Culicidae*) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomedica* 24: 385-92.
- Salazar, M. 2010. Caracterización bioquímica de la resistencia a insecticidas en cepas de campo de *Cx. quinquefasciatus* Say 1823 (Díptera: Culicidae) de diferentes regiones de Venezuela. Trabajo Especial de Grado, Fac. Agronomía, UC.
- Sanderson, M.J y Shaffer, H.B. 2002. Troubleshooting molecular phylogenetic analysis. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 33:49-72.
- Savage H, Miller B. House mosquitoes of the U.S.A., *Culex pipiens* complex. *Win Beats* 1995. 6:8-9.
- Scarpassa. V.M y 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.



- Sharma, A.K., Mendki, M.J., Tikar, S.N., Chandel, K., Sukumaran, D., Parashar, B.D. 2009. Genetic variability in geographical populations of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from India based on random amplified polymorphic DNA analysis. *Acta Tropica* 112:71-76
- Simon, C. 1991. Molecular systematics at the species boundary: exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA, pp. 33-71. *In* G. M. Hewitt, A.W.B. Johnston, and J.P.W. Young [eds.], *Molecular techniques in taxonomy*. Springer, Berlin, Germany.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Sutil, O. E. 1980. Enumeración histórica y geográfica de las especies de Culicidae de Venezuela ordenadas según su taxonomía. *Boletín Dirección Malariología Saneamiento Ambiental*, **20**: 1-32.
- Swofford D.L. 2002. PAUP a.0b10. Phylogenetic analysis using parsimony. Sinauer Associates., Inc. Sunderland, MA.
- Tajima, F., 1989 Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis. *Genetic* 123: 858-595.
- Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol.Ecol.* 7:381-397.
- Templeton, A.R. 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology* 17: 1877-1880.
- Thompson, J.D, Higgins, D.G, Gibson T.J.1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-4680.
- Travi B, Montoya J. 1994. Manual de entomología médica para investigadores de América Latina. Cali, Colombia: Cideim.
- Vezzani, D 2007. Review: Artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: a perfect match. *Trop. Med. International Health*, 12:299-313.

- Weaver S, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig G, Oberste S, Boshell J y col. Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. Lancet. 1996. 348:436-40.
- Wen Y, Muir L, Kay B. Response of *Culex quinquefasciatus* to visual stimuli. J Am Mosq Control Assoc 1997; 13:150-2.
- Wilkerson, R. C, P. Foster, C. Li y M. Mureb. 2005. Molecular phylogeny of Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* species complex (Diptera: Culicidae). Ann Entomol Soc Am. 98:918-925.
- Zunino, M y Zullini, A. 2003. Biogeografía, La dimensión espacial de la evolución. Primera Edición. Mexico, Distrito Federal.