

Artículo

Análisis morfométrico soporta la presencia de *Anopheles (Nyssorynchus) albitarsis* F (Diptera: Culicidae) en Venezuela, importante vector de los parásitos maláricos

Morphometric analysis supports the presence of *Anopheles (Nyssorynchus) albitarsis* F (Diptera: Culicidae) in Venezuela, important vector of malaria parasites

urn:lsid:zoobank.org:pub: 6A0AE9A0-9A01-4D18-9D3E-E4BBF739F7FD

Yasmin Rubio-Palis ^{1,2*} , Jorge E. Moreno ³ , Abimel Moreno ⁴ , Jorge Silva ² , Belkys Pérez ⁵ , Hernán Guzmán ² 

1. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana”, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, sede Aragua, Venezuela

2. Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental, SALAE “Dr. Arnoldo Gabaldon”, Maracay, Venezuela.

3. Museo de Investigaciones de Campo “Dr. Francisco Vitanza”, Tumeremo, Bolívar, Venezuela. SALAE “Dr. Arnoldo Gabaldon”, Maracay, Venezuela.

4. Museo del Instituto de Zoología Agrícola “Francisco Fernández Yépez”, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

5. Centro de Estudios en Zoología Aplicada (CEZA) - Museo de Zoología de la Universidad de Carabobo (MZUC), Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología,

Carabobo, Venezuela. E-mails: rubiopalis@gmail.com*, jorermo@gmail.com, abimoreno16@gmail.com, jsilvad@gmail.com, belperezster@gmail.com, bngp02@botmail.com

Resumen

Recientemente se ha confirmado la amplia distribución geográfica en Venezuela de *Anopheles albitarsis* F, especie del Complejo Albitarsis aún no descrita formalmente. Los estudios morfométricos son fundamentales para la elaboración de claves gráficas para la determinación de especies. A fin de contribuir a la caracterización morfológica de *A. albitarsis* F de Venezuela con base en alas y patas posteriores de poblaciones naturales de adultos, se realizó un estudio de morfometría tradicional de mosquitos recolectados en cuatro localidades en focos maláricos del estado Bolívar y en una localidad del estado Guárico, en el centro del país. El estudio se complementó con el análisis y comparación de los mismos caracteres morfológicos en especímenes de *A. albitarsis*, *A. deaneorum*, *A. janconnae*, *A. marajoara* y *A. oryzalimmetes*, depositados en la colección de Walter Reed Biosystematics Unit, Smithsonian Institution, USA. Se confirmó como carácter diagnóstico la razón longitud de la mancha prehumeral oscura de la vena Costa del ala dividido entre la longitud de la mancha humeral clara (PHD/HP) para separar las especies analizadas ($p < 0,0001$). El carácter longitud de la mancha basal oscura del tarsómero posterior 2 dividido entre la longitud del tarsómero posterior 2 ($DS-III_2/Ta-III_2$) mostró diferencias significativas ($p < 0,0001$) que permiten separar todas las especies, excepto para *A. deaneorum*. El presente estudio respalda la presencia de *A. albitarsis* F en Venezuela, siendo posible separar este linaje mitocondrial de las demás especies del Complejo con base en los caracteres diagnósticos en las alas PHD/HP y en las patas $DS- III_2/Ta-III_2$.

Palabras clave: Carácter diagnóstico, Complejo Albitarsis, hembras, morfometría tradicional.

Abstract

The wide distribution of *Anopheles albitarsis* F in Venezuela has been confirmed recently, a species of the Albitarsis Complex yet to be formally described. Morphometric studies are essential to develop illustrated keys for species identification. To contribute to the morphologic characterization of *Anopheles albitarsis* F from Venezuela, a traditional morphometric analysis was conducted based on the wings and hind legs of natural adult populations of mosquitoes collected in 4 localities in the malaria foci of Bolívar State and one population from Guárico, in the center of the country. The study was complemented with the analysis and comparison among the same morphologic characteristics in the identified species of the Complex: *A. albitarsis*, *A. deaneorum*, *A. janconnae*, *A. marajoara* and *A. oryzalimmetes*, deposited in the collection of the Walter Reed Biosystematics Unit, Smithsonian Institution, USA. The length of pre-humeral dark spot divided by the humeral spot (PHD/HP) on wing Costal vein was confirmed as a valid diagnostic characteristic to separate the species analyzed ($p < 0,0001$). The length of the basal dark spot on hind tarsomere 2 divided by the length of tarsomere 2 ($DS-III_2/Ta-III_2$) showed significant differences ($p < 0,0001$) making it possible to separate all species except *A. deaneorum*. This study supports the presence of *A. albitarsis* F in Venezuela; it is possible to separate this mitochondrial lineage from the other species within the Complex based on the diagnostic characters on the wings PHD/HP and on the legs $DS- III_2/Ta-III_2$.

Additional keywords: Albitarsis Complex, diagnostic character, females, traditional morphometry.

Recibido: 25-IX-2021, Aceptado: 10-II-2022, Revisado: 24-IV-2022

RUBIO-PALIS Y, MORENO JE, MORENO A, SILVA J, PÉREZ B, GUZMÁN H. 2022. Análisis morfométrico soporta la presencia de *Anopheles (Nyssorynchus) albitarsis* F (Diptera: Culicidae) en Venezuela, importante vector de los parásitos maláricos. ENTOMOTROPICA, 37 : 1-17.

on line Junio-2022

Introducción

Recientemente se ha confirmado la amplia distribución geográfica de *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* F en Venezuela, en Colombia al este de la Cordillera Oriental y en la isla de Trinidad (Zúñiga *et al.* 2021). Este linaje mitocondrial fue identificado por primera vez en Puerto Carreño, Vichada, Colombia, con base en los marcadores moleculares *white* gene, rDNA-ITS2 (Brochero *et al.* 2007) y secuencias de ADN *citocromo oxidasa c I mitocondrialmente codificada (MT-CO1)* (Ruíz-López *et al.* 2012).

Hasta el presente, se considera que el Complejo Albitarsis está integrado por cinco especies formalmente descritas: *A. albitarsis* Lynch-Arribáizaga, 1878, *A. marajoara* Galvão y Damasceno, 1942, *A. deaneorum* Rosa-Freitas, 1989, *A. oryzalimnetes* Wilkerson y Motoki, 2009 y *A. janconnae* Wilkerson y Sallum, 2009 y, cinco especies putativas con base en estudios moleculares: *A. albitarsis* F (Brochero *et al.* 2007), *A. albitarsis* G (Krzywinski *et al.* 2011, Ruíz-López *et al.* 2012), *A. albitarsis* I (Gutiérrez *et al.* 2010, Ruíz-López *et al.* 2012), *A. albitarsis* H (Ruíz-López *et al.* 2012) and *A. albitarsis* J (Motoki *et al.* 2021). Ruíz-López *et al.* (2012) y Foley *et al.* (2014) han encontrado restricciones geográficas en la distribución de estas especies, evidenciándose que las especies *A. albitarsis* F, *A. albitarsis* I, *A. janconnae* y *A. marajoara* se encuentran al norte del río Amazonas, mientras las demás especies al sur de este.

Estudios morfométricos previos de 12 poblaciones de Venezuela de *A. albitarsis sensu lato*, así como análisis molecular (RAPD-PCR) de una población de Calabozo, estado Guárico concluyeron que *A. marajoara* era la única especie del Complejo Albitarsis presente en Venezuela (Rubio-Palis *et al.* 2003). Sin embargo, posteriormente se ha confirmado, con base en estudios moleculares utilizando ADN *MT-CO1*, la presencia de *A. albitarsis* F en los estados Bolívar, Cojedes, Guárico, Portuguesa y Zulia (Ruíz-López *et al.* 2012, Rubio-Palis *et al.* 2013a, Zúñiga *et al.* 2021). Además, en el estado Zulia se ha reportado en simpatria con *A. albitarsis* I, linaje mitocondrial que se extiende hacia el norte de Colombia en los valles entre las Codilleras Central y Oriental (Gutiérrez *et al.* 2010, Ruíz-López *et al.* 2012, Gómez *et al.* 2013). Zúñiga *et al.* (2021) sugieren que todos los informes previos sobre distribución geográfica, bionomía e incriminación como vector de los parásitos maláricos de *A. albitarsis s.l y/o*

A. marajoara corresponden a estas dos especies putativas, las cuales aún no se han descrito formalmente.

Los estudios morfométricos han contribuido a la elaboración de claves gráficas para la determinación específica de anofelinos y para determinar variaciones intra e inter-poblacionales (Rubio-Palis 1998, Rubio-Palis 2000, González y Carrejo 2010, Pacheco *et al.* 2017, Sallum *et al.* 2021). A fin de contribuir a la determinación de *A. albitarsis* F de Venezuela con base en caracteres morfológicos de las alas y patas posteriores de poblaciones naturales de adultos, se realizó un estudio de morfometría tradicional de mosquitos recolectados en cinco localidades, cuatro de ellas en focos calientes de transmisión de malaria en el estado Bolívar (Grillet *et al.* 2021) donde se ha incriminado como importante vector de los parásitos maláricos (Moreno *et al.* 2009) y una del estado Guárico. Además, se analizaron y compararon los mismos caracteres morfológicos en especímenes de *A. albitarsis*, *A. deaneorum*, *A. janconnae*, *A. marajoara* y *A. oryzalimnetes*, depositados en la colección de Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU), Smithsonian Institution, Museum Support Center, Suitland, Maryland, USA.

Materiales y métodos

Áreas de estudio

Se seleccionaron cinco localidades para la recolección de larvas y hembras adultas de mosquitos, cuatro en áreas endémicas de malaria en el estado Bolívar (municipios Sifontes y Sucre) y una localidad del estado Guárico (Tabla 1), donde actualmente se han registrado casos de malaria, pero no se cuenta con información entomológica reciente.

En el estado Guárico, se seleccionó la parcela #14 de El Rastro, ubicada a 14 km del centro de la ciudad de Calabozo, municipio Francisco de Miranda y caracterizada, al igual que las demás de la zona, por estar dedicada al cultivo de arroz. Recientemente se ha confirmado la presencia de *A. albitarsis* F en esta localidad (Zúñiga *et al.* 2021).

En el estado Bolívar, municipio Sucre, se seleccionó la localidad de Jabillal, la cual ha sido previamente descrita (Rubio-Palis *et al.* 2010, Rubio-Palis *et al.* 2013b) y donde se ha confirmado la presencia de *A. albitarsis* F (Rubio-Palis *et al.* 2013a). En el municipio Sifontes se seleccionaron tres localidades cuyas características demográficas,

geográficas y climáticas han sido ampliamente descritas (Moreno *et al.* 2014): Tumeremo, área urbana capital administrativa del municipio de aproximadamente 38 mil habitantes; San Rafael, localidad minera de oro ubicada en la parroquia Dalla Costa a 60 km al sur de Tumeremo y Las Cristinas, principal área minera y foco caliente de malaria del municipio ubicada en la parroquia San Isidro a 130 km en línea recta al sur de Tumeremo.

Recolección de mosquitos

Las hembras adultas fueron recolectadas por los investigadores e inspectores de Salud Pública del MPP Salud asociados al Programa de Control de Malaria, por lo cual no fueron necesarios permisos especiales,

ni consideraciones éticas. Previo a las recolecciones, se solicitaba el permiso de los propietarios y se explicaba el tipo de actividad a realizar. Siempre que fue posible se recolectaron larvas, utilizando las técnicas previamente descritas por Moreno *et al.* (2015) y Rubio-Palis (2015), se criaron hasta adultos o se alimentaron hembras recolectadas para la obtención de isofamilias. A fin de establecer caracteres diagnósticos en hembras adultas que permitan diferenciar las especies del Complejo Albitarsis, se analizaron hembras formalmente identificadas como *A. albitarsis*, *A. deaneorum*, *A. janconnae*, *A. marajoara* y *A. oryzalimnetes* depositadas en la colección del WRBU, Smithsonian Institution, USA (Tabla 2).

Tabla 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Anopheles albitarsis* F analizadas de Venezuela.

Estado	Localidad	Fecha	Coordenadas	Altitud (m)
Guárico	Calabozo (finca El Rastro)	2016	lat 08°04'N, long 67°24'W	101
Bolívar	Jabillal	2014	lat 07°03'N, long 64°58'W	46
Bolívar	San Rafael (mina La Camorra)	2014	lat 06°47'N, long 61°34'W	127
Bolívar	Las Cristinas (mina Mesones)	2016	lat 06°12'32"N, long 61°28'26"W	153
Bolívar	Tumeremo	2015	lat 07°14'50"N, long 61°20'54"W	270

Tabla 2. Material examinado de las cinco especies del Complejo Albitarsis depositadas en la colección del Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU), Smithsonian Institution, USA.

Especie	País	Estado/ Departamento	Localidad	Coordenadas	Colección*	Fecha
<i>An. albitarsis</i>	Argentina	Misiones	Posadas	lat 27°23' S, long 65°53' W	AR1	1992
<i>An. deaneorum</i>	Brasil	Mato Grosso	Santo Antonio de Leverger	lat 15°51.53' S, long 56°03.48' W	BR700	1995
		Mato Grosso	Peixoto de Azevedo	lat 10°23' S, long 54°54' W	BR518	1994
<i>An. janconnae</i>	Brasil	Roraima	Boa Vista	lat 02°49' S, long 60°40' W	BR26	2002
<i>An. marajoara</i>	Brasil	Pará	Ilha do Marajó		BR001	1991
<i>An. oryzalimnetes</i>	Brasil	São Paulo	São Paulo		BR501	1992
	Brasil	São Paulo	São Paulo		BR544	1994
	Paraguay	Alto Paraná	Hernandarios	lat 25°22' S, long 54°45' W	PA2	1992

(*) Incluye ejemplares analizados en la revisión de Motoki *et al.* (2009).

Estudio morfométrico

Se midieron caracteres seleccionados en alas y patas posteriores de 129 hembras y 61 machos de cinco poblaciones de Venezuela (Tabla 1). Se utilizó un microscopio estereoscópico marca Leica ZM-160A con ocular 10x con micrómetro (100 divisiones: 1 mm) y zoom 4x. Las alas y patas de mosquitos individuales (hembras y machos) se disecaron y se montaron secas en posición dorsal entre porta y cubre objeto y selladas con bálsamo del Canadá. La longitud del ala (LA) se midió desde la alulae hasta la inserción de la vena R3 en la margen del ala. Para el estudio de los mosquitos de la colección del WRBU se utilizó un microscopio estereoscópico marca Olympus modelo S2, ocular 10x con micrómetro (100 divisiones= 1 mm). Se midieron las manchas de escamas claras y oscuras sobre la vena Costa del ala a partir de la mancha prehumeral oscura (PHD), humeral clara (HP), humeral oscura (HD), presectorial clara (PSP), presectorial oscura (PSD),

sectorial clara (SP), sectorial oscura proximal (PRSD), accesorial clara (ASP), sectorial oscura distal (DSD), subcosta clara (SCP), preapical oscura (PD) y preapical clara (PP) (Figura 1A). Las manchas basal clara + prehumeral clara (BP + PHP) y apical oscura (AD) no se consideraron debido a la presencia de daños en estas regiones del ala en la mayoría de los ejemplares. Los caracteres medidos en las patas fueron la longitud del segundo tarsómero posterior (Ta-III₂) y la banda proximal de escamas oscuras del segundo tarsómero posterior (DS-III₂) (Figura 1B). La terminología y abreviaciones empleadas es la de Wilkerson y Peyton (1990) y Rubio-Palis (1998). Los ejemplares examinados (montajes permanentes de alas y patas) se encuentran depositados en el Museo Entomológico “Dr. Pablo Cova García”, Maracay, Venezuela y en el Walter Reed Biosystematic Unit (WRBU), Smithsonian Institution, Museum Support Center, Suitland, USA.

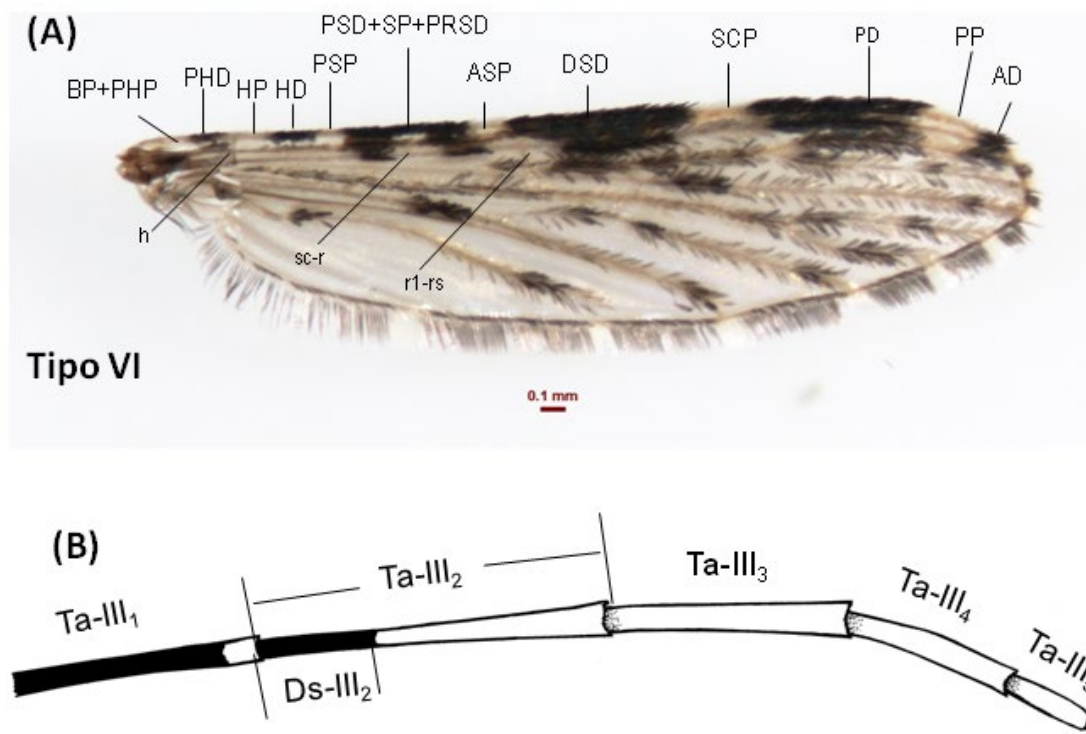


Figura 1. A, Ala Tipo VI característica de *Anopheles albittarsis* F, se indican las manchas de escamas claras y oscuras medidas en la vena Costa (Foto: YRP, cámara digital Nikon® DS-2MV aumento 30x, acoplada a un microscopio estereoscópico Nikon® 5MZ 800); **B,** Tarsos posterior de *Anopheles albittarsis* F.

Análisis estadístico

Es ampliamente conocido que en los mosquitos, el tamaño del ala y por ende, de la longitud de cada mancha de escamas sobre la vena Costa, varía dependiendo no sólo de la especie sino que está fuertemente asociado a la disponibilidad de alimento en los hábitats larvales (Fish 1985, Wallace y Merritt 1999, Schneider *et al.* 2004, Souza *et al.* 2019, van Schoor *et al.* 2020). Por tal motivo, en el presente estudio se estimaron las estadísticas descriptivas media aritmética, desviación estándar (SD) y error estándar (SE), así como los valores máximos y mínimos de la razón longitud de cada mancha de escamas sobre la vena Costa dividido entre la longitud del ala y de la razón de la longitud de la mancha proximal oscura del tarsómero posterior 2 dividida entre la longitud del tarsómero posterior 2 ($DS-III_2/Ta-III_2$) para todos los mosquitos por localidad y sexo. En todos los casos se midieron las alas derecha e izquierda, así como también las patas derecha e izquierda.

Con la finalidad de evaluar las posibles diferencias entre las poblaciones de Venezuela de *A. albitarsis* F, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para cada una de las distintas razones mancha/longitud del ala. La normalidad de cada una de las variables fue corroborada con una prueba de Shapiro-Wilk, aunque para algunas de las variables la prueba detectó diferencias estadísticas significativas, la inspección gráfica (histogramas y Q-Q *plots*) no reveló desviaciones importantes de la normalidad. La homogeneidad de varianzas fue corroborada mediante una prueba de Bartlett. Las diferencias en la razón PHD/HP y $DS-III_2/Ta-III_2$ también fueron analizadas mediante análisis de la varianza, previa evaluación de las distribuciones de las variables y la homogeneidad de las varianzas. Estos análisis se realizaron para las cinco poblaciones de Venezuela, posteriormente se realizaron comparaciones con otras especies del Complejo *Albitarsis* utilizando las poblaciones de *A. albitarsis* F de Venezuela como un grupo único. En todos los casos se realizó una prueba de Tukey como prueba *a posteriori*.

Las frecuencias de los tipos de alas (Rubio-Palis 1998, Pacheco *et al.* 2017) fueron analizadas mediante pruebas de razón de verosimilitud (likelihood ratio test, LR test), ya que un gran porcentaje de las celdas tenían valores esperados por debajo de 5. Todos los análisis se llevaron

a cabo en el ambiente para el cómputo estadístico R (R Core Team 2020). Adicionalmente, se utilizó el software GraphPad Prism 6.00 (Swift 1997) para generar los gráficos con las medias y las desviaciones estándar.

Resultados

Se analizaron un total de 190 mosquitos, 129 hembras y 61 machos recolectados en Venezuela y 57 hembras de las especies del Complejo *Albitarsis* depositadas en la colección del WRBU.

Alas. Con el fin de establecer caracteres diagnósticos confiables en hembras y machos de este linaje mitocondrial, se compararon los valores promedio (prueba t) de la razón estimada para cada mancha de escamas sobre la vena Costa y la longitud del ala de las cinco poblaciones de Venezuela, para ambas alas (derecha e izquierda) de hembras y machos. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las razones del ala izquierda en relación con el ala derecha en las hembras ($N= 129$), pero sí en los machos, dependiendo de la población y del carácter medido ($p < 0,05$) ($N= 61$). Además, al comparar las razones estimadas en el ala derecha de los machos, se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,001$), las cuales variaban de acuerdo con las poblaciones y con el sexo. Estos análisis muestran la ausencia de caracteres en las alas de los machos que resulten confiables para su utilización como caracteres diagnósticos.

Al no encontrar diferencias significativas intra-poblacionales para los caracteres analizados en el ala derecha de las hembras, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las cinco poblaciones de Venezuela. Se encontraron diferencias significativas para las razones HD/LA ($F_{4,122}$; $p < 0,001$), PSP/LA ($F_{4,117} = 4,126$; $p = 0,003$), ASP/LA ($F_{4,114} = 3,044$; $p = 0,02$) y SP/LA ($F_{4,122} = 5,398$; $p = 0,01$) y estabilidad en la variable PHD/HP ($F_{4,121} = 1,396$; $p = 0,239$), la cual se utiliza como carácter diagnóstico para separar especies del subgénero *Nyssorynchus* Blanchard, 1902. La Figura 2 muestra los *boxplots* para cada una de las razones tamaño mancha del ala derecha de hembras dividido entre el tamaño del ala de las cinco poblaciones estudiadas, donde los puntos rojos representan la media y la línea horizontal, la mediana. Se observa que la media y la mediana son cercanas en

la mayoría de los casos, indicando que las distribuciones de las variables son aproximadamente simétricas. Sin embargo, para la razón HD/LA, las comparaciones *a posteriori* con la prueba de Tukey mostraron que, en

promedio, esta razón es significativamente mayor en la población de Tumeremo en comparación con las poblaciones de Calabozo (diferencia de medias = 0,0425; IC 95%: [0,0142; 0,0709]; $p < 0,001$), Jabillal (diferencia

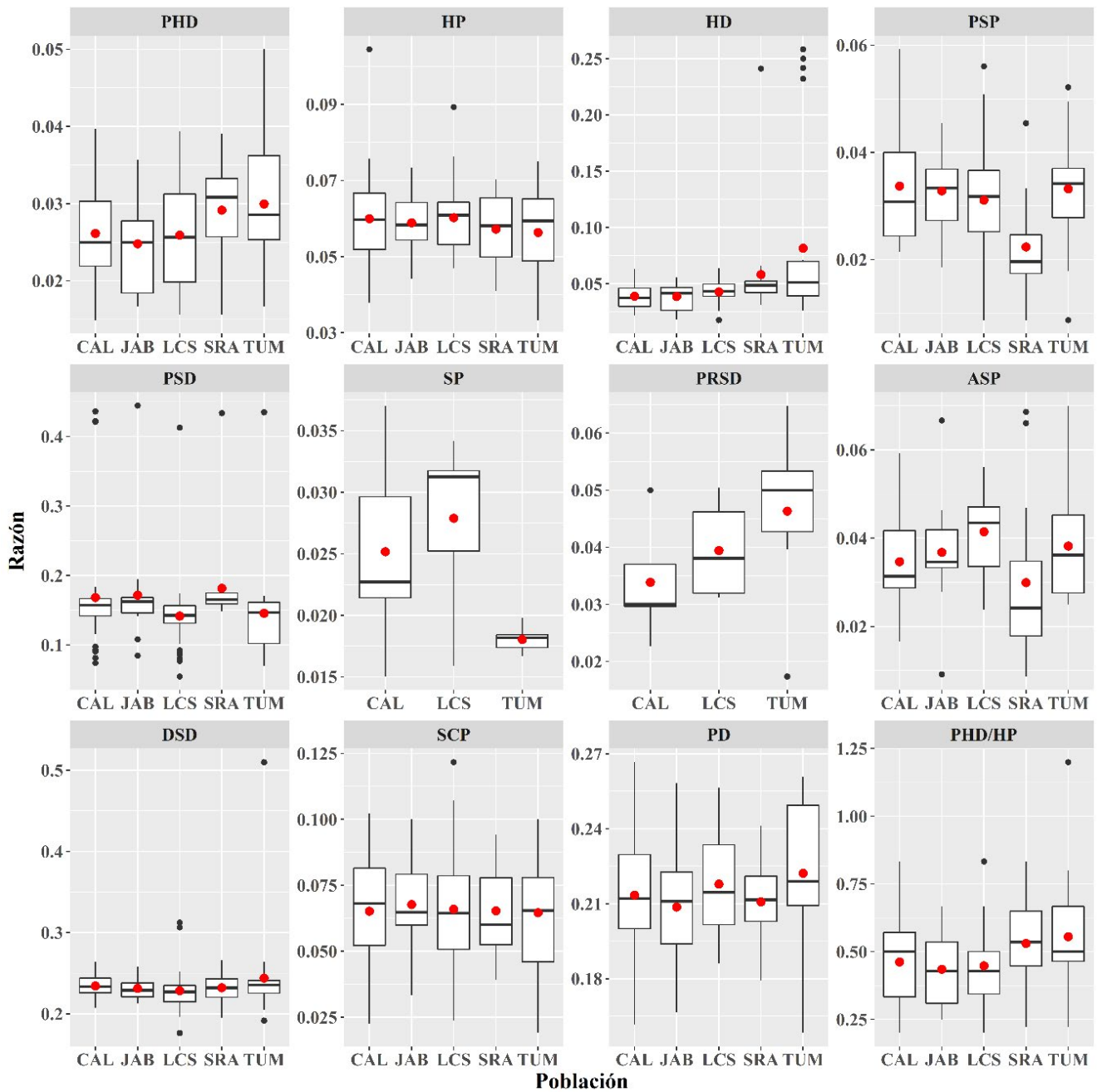


Figura 2. *Boxplots* para las razones mancha/longitud del ala para cada población de *Anopheles albitalis* F de Venezuela. Los puntos rojos representan las medias. CAL= Calabozo; JAB= Jabillal; LCS= Las Cristinas; SRA= San Rafael; TUM= Tumeremo.

de medias = 0,0429; IC 95%: [0,0074; 0,0783]; $p = 0,009$) y Las Cristinas (diferencia de medias = 0,0387; IC 95%: [0,0099; 0,0675]; $p = 0,002$). No obstante, es importante resaltar que la población de Tumeremo presenta una serie de valores extremos para la razón HD/LA, los cuales causan una inflación notable de la media (Figura 2). Por su parte, las diferencias para la razón PSP/LA sólo fueron significativas entre las poblaciones de San Rafael y Calabozo (diferencia de medias = -0,0114; IC 95%: [-0,0195; -0,0032]; $p = 0,001$). Para la razón ASP/LA, sólo las poblaciones de San Rafael y Las Cristinas mostraron diferencias significativas (diferencia de medias = -0,0115; IC 95%: [-0,0213; -0,0017]; $p = 0,01$). Finalmente, la razón SP/LA fue significativamente menor en la población de Tumeremo, en comparación con la población de Las Cristinas (diferencia de medias = -0,0098; IC 95%: [-0,0178; -0,0019]; $p = 0,01$).

A fin de profundizar el análisis, en cuanto a la variabilidad inter-poblacionales de estos caracteres y con base en la presencia de diferentes tipos de alas en anofelinos del subgénero *Nyssorhynchus* (Pacheco *et al.* 2017, Rosa-Freitas *et al.* 1990, Rubio-Palis 1998, Rubio-Palis 2000), se identificaron y analizaron los tipos de alas en todas las poblaciones de *A. albitarsis* F estudiadas, así como para las demás especies del Complejo.

En efecto, el análisis de los patrones en las alas mostró que, en general, el ala Tipo VI, en la cual la mancha Sectorial Clara (SP) está ausente y se fusionan las manchas PSD+SP+PRSD, fue el más frecuente en todas las poblaciones de Venezuela (75,4%), seguido del Tipo I (13,9%) (Figura 3). La Figura 4 muestra las proporciones de cada tipo de ala encontrada en cada población de Venezuela; la población de Tumeremo presentó la mayor diversidad de tipos de ala. La prueba de razón de verosimilitud (test LR) fue significativa ($\chi^2_{20} = 109,91$, $p < 0,0001$), indicando asociación entre los tipos de alas y las poblaciones.

Con base en estas observaciones, se realizó un ANOVA considerando solo los especímenes con ala Tipo VI y nuevamente se encontraron diferencias significativas para las razones HD/LA, PSP/LA, PSD/LA y ASP/LA (Figura 5). Para estas cuatro variables, la prueba *a posteriori* (prueba de Tukey) mostró diferencias entre dos o tres poblaciones (Figura 5).

En cuanto a las demás especies del Complejo Albitarsis estudiadas, encontramos varios tipos de alas (Figura 6), algunos de los cuales no observados en las poblaciones de *A. albitarsis* F de Venezuela. En general, el ala Tipo VI es la más frecuente en todas las especies del Complejo (44,44%); *A. albitarsis* y *A. janconnae* presentan la mayor diversidad de tipos de alas, observándose los Tipos XV, XVII y XX, este último observado por primera vez en un espécimen de *A. albitarsis* de Misiones, Argentina. Este tipo de ala se caracteriza por presentar la fusión de las manchas de escamas claras y oscuras de la Costa PSC+PSD+SP+ASP+SD+SCP+PD.

El análisis de la razón PHD/HP para las distintas especies del Complejo Albitarsis resultó significativo ($F_{5,172} = 9,002$; $p < 0,0001$). Si bien, el tamaño pequeño de las muestras podría afectar la homogeneidad de la varianza, la prueba de Barlett resultó no significativa al excluir los valores para *A. deaneorum* ($K^2 = 5,51$; $p > 0,05$). La prueba de Tukey reveló diferencias significativas para seis pares de especies (Tabla 3). Aunque se observaron diferencias significativas al tratar las poblaciones de *A. albitarsis* F por separado en el análisis anterior, al tratarlas como un grupo único no se observa gran variabilidad y las diferencias con otras especies del complejo son marcadas, la superposición con aquellas especies donde se detectaron diferencias significativas es muy pequeña o inexistente (Figura 7A).

Pata. El análisis de varianza (ANOVA) de la media de la razón longitud de la mancha oscura proximal del tarsómero posterior 2 dividido entre la longitud del tarsómero posterior 2 ($DS-III_2/Ta-III_2$) de la pata derecha arrojó diferencias significativas entre las distintas poblaciones de Venezuela ($F_{4,116} = 5,64$; $p < 0,001$); los resultados del análisis *a posteriori* se muestran en la Tabla 4. Los valores promedios para la población de Tumeremo son similares a las demás poblaciones, y las poblaciones de Jabillal y San Rafael son las más diferentes.

Al considerar la razón $DS-III_2/Ta-III_2$ para todas las especies del Complejo, excluyendo *A. deaneorum*, también se encontraron diferencias significativas ($F_{5,167} = 14,33$; $p < 0,0001$), que permiten utilizar este carácter para separar entre las especies. Nuevamente, si bien el tamaño de la muestra es pequeño, la prueba de Barlett mostró homogeneidad entre las varianzas ($K^2 = 1,17$; $p > 0,05$) (Tabla 5, Figura 7B).

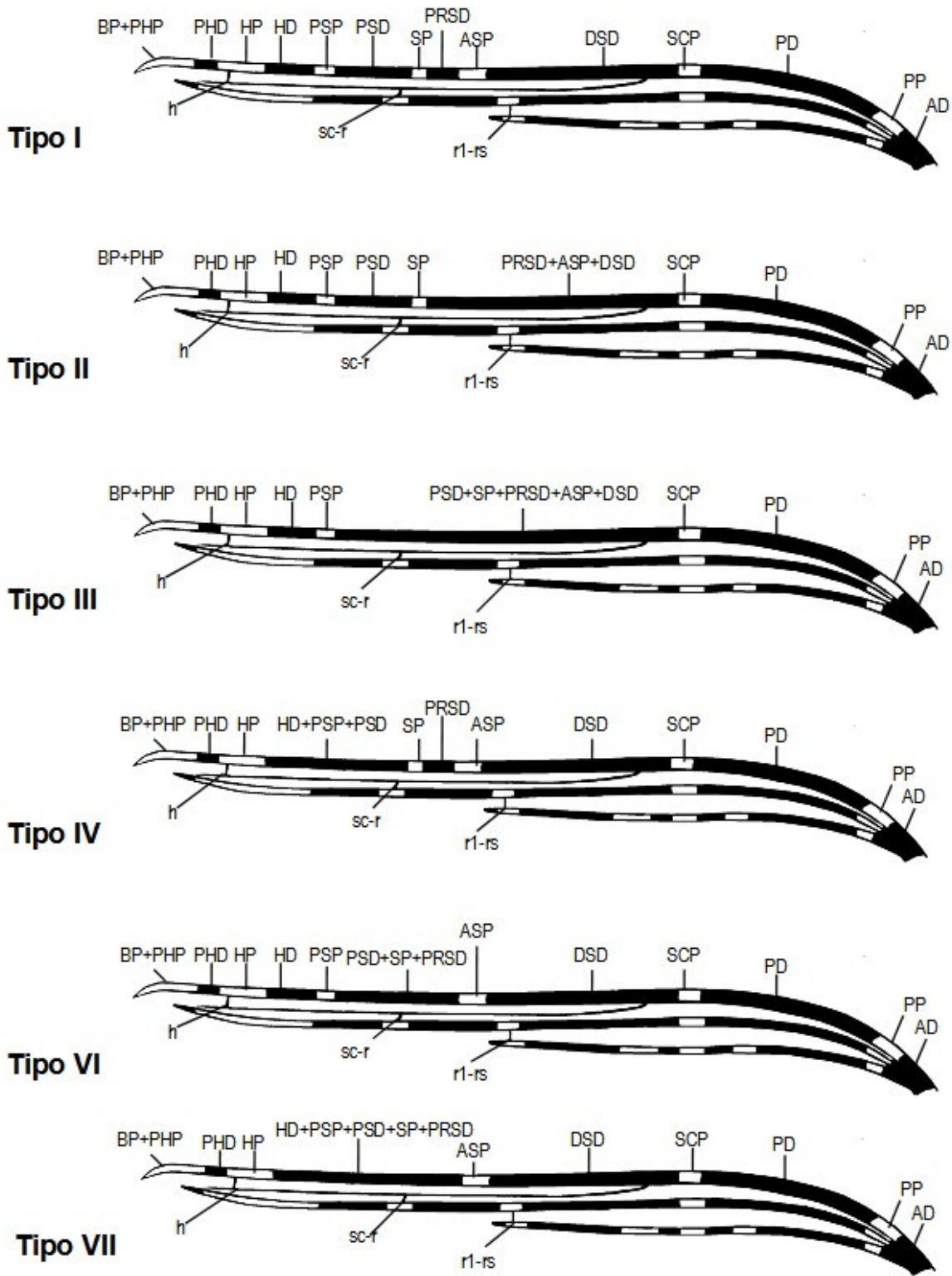


Figura 3. Tipos de alas observados en poblaciones de *Anopheles albitalarsis* F de Venezuela, y en otras especies del Complejo Albitarsis.

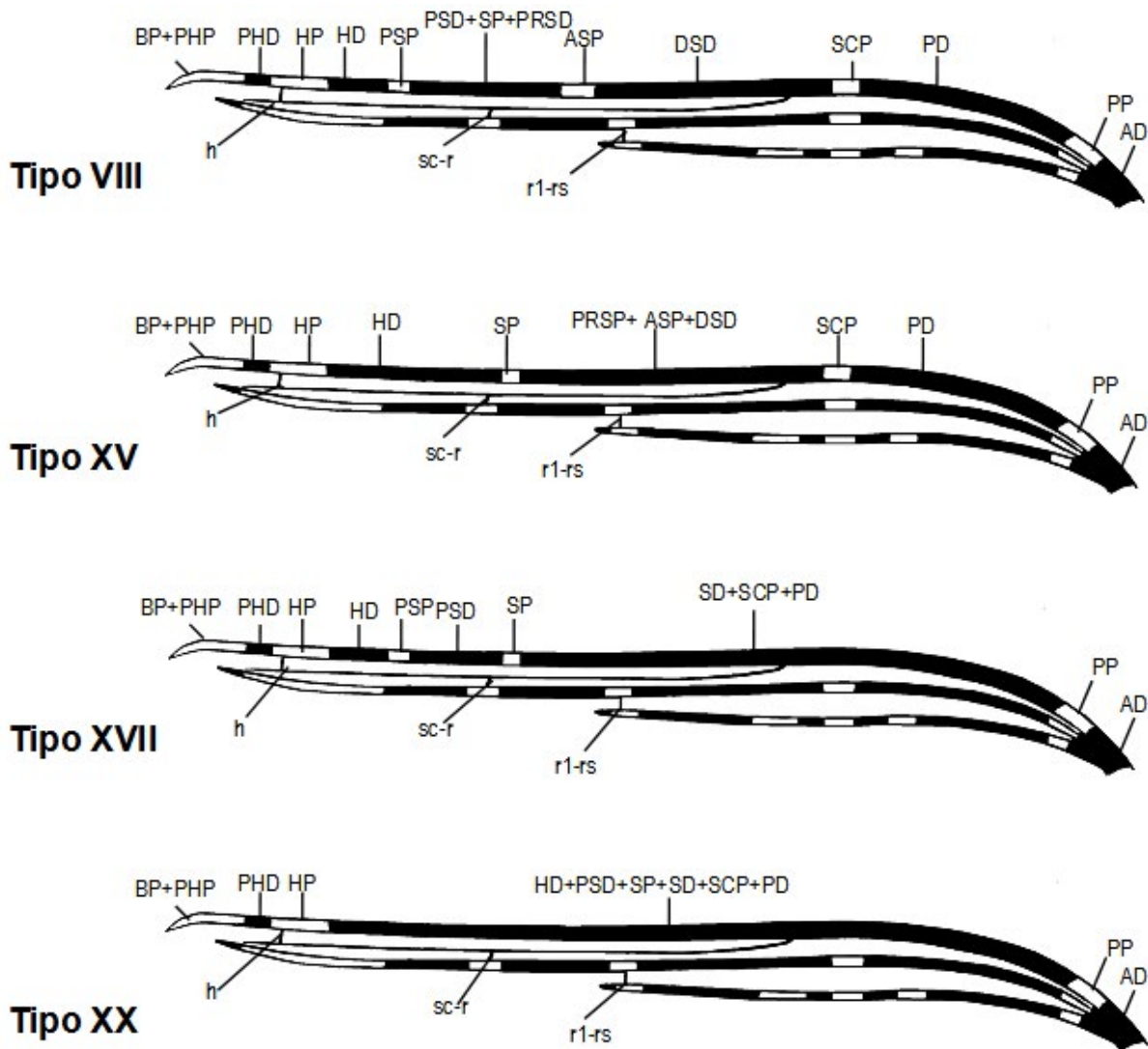


Figura 3. cont. Tipos de alas observados en poblaciones de *Anopheles albitarsis* F de Venezuela, y en otras especies del Complejo Albitarsis.

Discusión

El presente estudio aporta caracteres diagnósticos que permiten identificar a las hembras de *A. albitarsis* F de Venezuela y separarla de las especies descritas del Complejo. En efecto, la razón longitud de la mancha prehumeral oscura (PHD) dividida entre la longitud de la mancha humeral clara (HP) resultó un carácter confiable y estable en todas las poblaciones de Venezuela estudiadas y su rango es amplio, variando de 0,20 a 0,83,

media $0,47 \pm 0,16$ (Tabla 3). Este se encuentra dentro del rango indicado por Rubio-Palis *et al.* (2003) para *A. albitarsis* F previamente identificada como *A. marajoara* (0,22 – 1,0) y para *A. albitarsis* F (n=4) de la localidad de Jabillal (0,3 – 0,5); estos resultados respaldan lo señalado por Zúñiga *et al.* (2021) en cuanto a que los reportes previos sobre *A. marajoara* de Venezuela corresponden realmente a *A. albitarsis* F. Cabe destacar que el rango reportado para Venezuela de este carácter está dentro del rango (0,4 – 0,6) señalado por Pacheco *et al.* (2018) de los

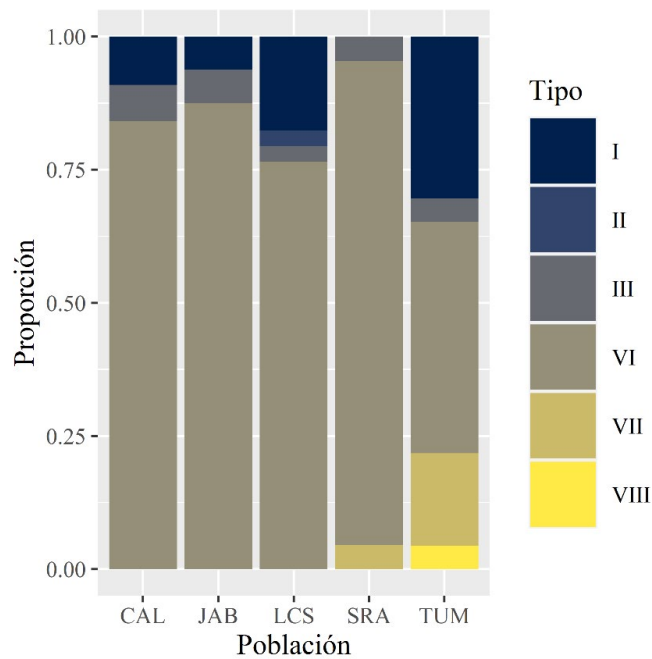


Figura 4. Proporciones de cada tipo de alas encontradas en diferentes poblaciones de *Anopheles albitarsis* F de Venezuela. CAL= Calabozo; JAB= Jabillal; LCS= Las Cristinas; SRA= San Rafael; TUM= Tumeremo.

datos sin transformar en dos poblaciones de *A. albitarsis* F de Colombia; mientras que los datos transformados a arcosen para normalizar los valores resultaron en rangos de 1,17 – 1,19, los cuales no se corresponden con reportes previos y el presente trabajo donde, en general, el tamaño de HP \geq PHD en especies del Complejo Albitarsis (Rosa-Freitas *et al.* 1989, Rubio-Palis 2000, Rubio-Palis *et al.* 2003; Rubio-Palis *et al.* 2013). Cabe señalar que en la revisión y descripción de las especies del Complejo Albitarsis realizada por Motoki *et al.* (2009), así como en las claves recientemente publicadas por Sallum *et al.* (2020), no se utiliza este carácter para separar a las especies del Complejo. Sin embargo, en el presente estudio (Tabla 3, Figura 7) encontramos que este es un carácter diagnóstico válido que permite separar las tres especies del Complejo que se encuentran al norte del río Amazonas (Zúñiga *et al.* 2021): *A. albitarsis* F, *A. janconnae* y *A. marajoara* ($p < 0,01$). Si bien se han realizado estudios de morfometría geométrica de *A. albitarsis* I de Colombia (Gómez *et al.* 2013), no se cuenta con estudios de morfometría tradicional para comparar con *A. albitarsis* F; además, este carácter es útil para separar *A. oryzalimnetes* de *A. marajoara* ($p < 0,05$) y *A. albitarsis* de

A. janconnae ($p < 0,001$). Mientras que hay solapamiento de los rangos de *A. deaneorum* con todas las especies y de *A. albitarsis* con *A. marajoara* ($p > 0,05$). Cabe enfatizar, con base en la distribución geográfica de estas especies, que la razón PHD/HP es un carácter confiable para separar las especies del Complejo, particularmente en el norte de Sur América.

Pacheco *et al.* (2018) informaron, al igual que en el presente estudio, que el patrón de manchas claras y oscuras sobre la vena Costa del ala más frecuente es el Tipo VI (74%) seguido del Tipo I (26%), coincidiendo con nuestros resultados. Sin embargo, en el presente estudio se reportan además la presencia de alas Tipo II, III y IV (Figura 3), y los análisis mostraron que la proporción de cada tipo de ala presente es característico para cada localidad ($\chi^2_{20} = 109,91$, $p < 0,0001$) (Figura 4). Resultados similares fueron reportados por Rubio-Palis (1998) para *A. darlingi* Root, 1926, de Venezuela donde el patrón más frecuente en las alas fue el Tipo I. Cabe resaltar que en la publicación de Pacheco *et al.* (2018) hay un error en la Figura 2, donde se muestran alas de *A. darlingi* en lugar de *A. albitarsis* F, la cual es claramente diferenciable de las demás especies de la

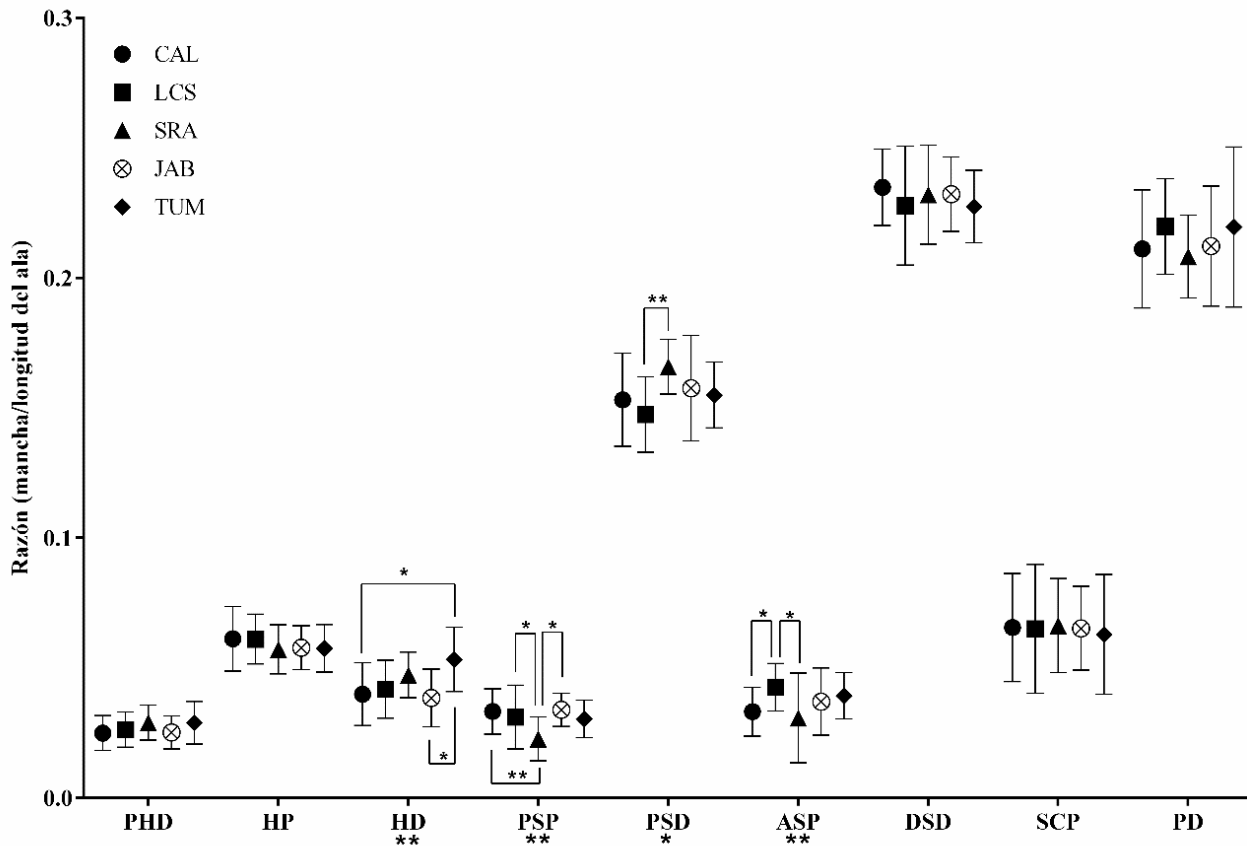


Figura 5. Medias de las distintas razones mancha/longitud del ala para cada población de *Anopheles albitarsis* F con ala Tipo VI. Las líneas representan la desviación estándar y los asteriscos indican pares con diferencias significativas. Códigos de significancia: * < 0,05, ** < 0,01. CAL= Calabozo; LCS= Las Cristinas; SRA= San Rafael; JAB= Jabillal; TUM= Tumeremo.

Sección *Argyritarsis* (Levi Castillo 1949) del subgénero *Nyssorhynchus* por que la mancha PHD >> HP y por ende la razón PHD/HP > 1,5 (1,37-15,0) (Rubio-Palis *et al.* 2003). Además, Pacheco *et al.* (2018) muestran en la Figura 2 alas Tipo I y Tipo V, esta última se caracteriza por estar ausente la mancha SCP y la fusión de las manchas DSD+SCP+PD (Rubio-Palis 1998); este tipo de ala (Tipo V) no ha sido observado en el presente estudio ni en los estudios previos en 12 poblaciones de *A. albitarsis* F (como *A. marajoara*) de Venezuela, donde solo se observaron los Tipo I y VI (Rubio-Palis *et al.* 2003). Con base en los errores detectados en la publicación de Pacheco *et al.* (2018), no es posible comparar los caracteres diagnósticos PHD/HP y tipos de alas entre los únicos estudios existentes sobre morfometría tradicional de *A. albitarsis* F.

En cuanto a las demás especies del Complejo, encontramos varios tipos de alas (Figuras 3 y 6), algunos de los cuales no observados en las poblaciones de *A. albitarsis* F de Venezuela. En general, el ala Tipo VI es la más frecuente en todas las especies del Complejo; *A. albitarsis* y *A. janconnae* presentan la mayor diversidad de tipos de alas, observándose los Tipos XV y XVII reportados previamente en poblaciones de *A. darlingi* de Colombia (Pacheco *et al.* 2017) y el Tipo XX, observado por primera vez en un espécimen de *A. albitarsis* de Misiones, Argentina (Figura 6). Cabe mencionar que Rosa-Freitas *et al.* (1990) reportaron la presencia de ocho tipos de alas en *A. albitarsis* y *A. deaneorum*; si bien el número de ejemplares de *A. albitarsis* (6) y *A. deaneorum* (4) analizados en el presente estudio fue bajo, no fue posible comparar con los tipos reportados

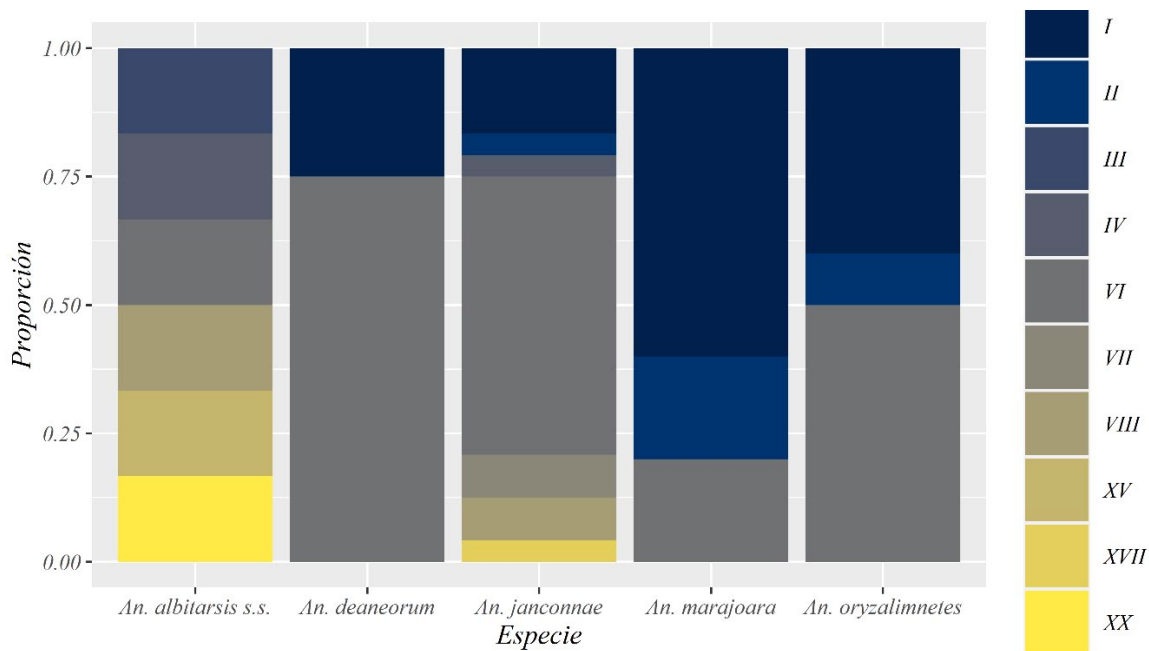


Figura 6. Proporciones de cada tipo de alas encontradas en diferentes especies del complejo *Anopheles albitarsis*.

por Rosa-Freitas *et al.* (1990), ya que en algunos tipos está presente la mancha basal oscura (BD) y en otros está ausente la mancha PHD, además de utilizar una nomenclatura diferente que se puede prestar a confusión. Es importante señalar que si bien Wilkerson y Peyton (1990), no incluyeron especímenes de *A. deaneorum* en su estudio de revisión y estandarización de la nomenclatura de las manchas de las alas del género *Anopheles* Meigen, 1818, establecen como característica de las especies del subgénero *Nyssorhynchus* la ausencia de la mancha Basal Oscura (BD), estando fusionadas las manchas basal clara y la prehumeral clara (BP+PHP). Resulta relevante mencionar que en el presente estudio se analizaron especímenes pertenecientes a las mismas colecciones estudiadas en la revisión y descripciones morfológicas realizada por Motoki *et al.* (2009), quienes no comentan sobre la presencia de la mancha basal oscura (BD) y presentan las medidas de las manchas fusionadas basal clara y prehumeral clara (BP+PHP) para *A. albitarsis* y *A. deaneorum*. Se ha reconocido desde principios del siglo XX la diversidad de patrones de las manchas claras y oscuras sobre la vena Costa del ala en el género *Anopheles*, encontrándose patrones característicos

para cada subgénero (Wilkerson y Peyton 1990); sin embargo, no se han formulado hipótesis para tratar de explicar estas variaciones intraespecíficas. Se observa en el presente trabajo y en *A. darlingi* (Rubio-Palis 1998) que los tipos de ala están asociados significativamente a cada población estudiada, por lo que podemos hipotetizar que tal variación fenotípica obedece a condiciones ambientales (bióticas y/o abióticas). Hasta el presente, hay un solo estudio donde se intenta relacionar cambios en la temperatura sobre el tamaño y patrón de las manchas sobre la vena Costa del ala en *A. triannulatus* (Neiva y Pinto 1922), no encontrándose relación para esta variable (González Obando *et al.* 2021). Estos resultados sugieren que posiblemente la variabilidad fenotípica se deba a la interacción de dos o más factores ambientales.

Un carácter diagnóstico que permite separar las especies del subgénero *Nyssorhynchus* es la razón $DS-III_2/Ta-III_2$. En el presente trabajo se reporta un rango amplio y variable en las diferentes poblaciones analizadas (0,31 – 0,46), el cual se solapa al rango (0,38 – 0,54) reportado por Pacheco *et al.* (2018) para *A. albitarsis* F de Colombia y *A. albitarsis* F (como *A. marajoara*) de

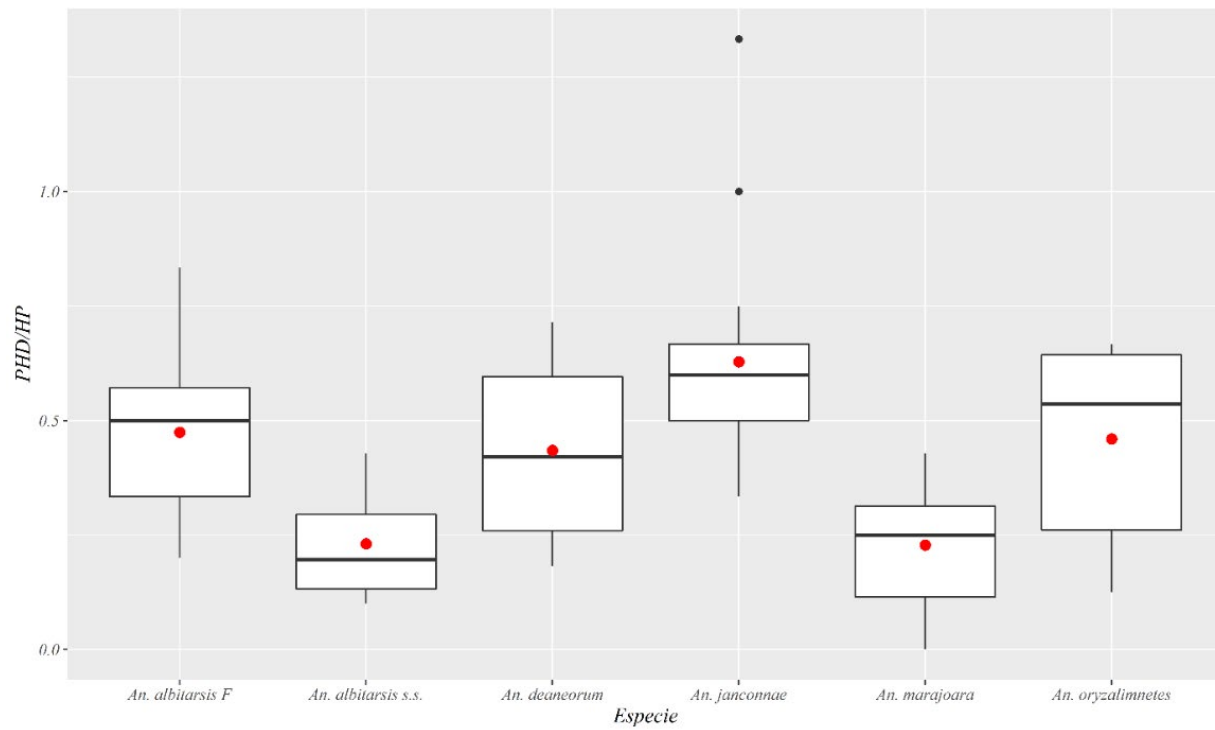


Figura 7A. *Boxplots* para la razón PHD/HP de las distintas especies del complejo *Anopheles albitarsis*. Los puntos rojos representan las medias.

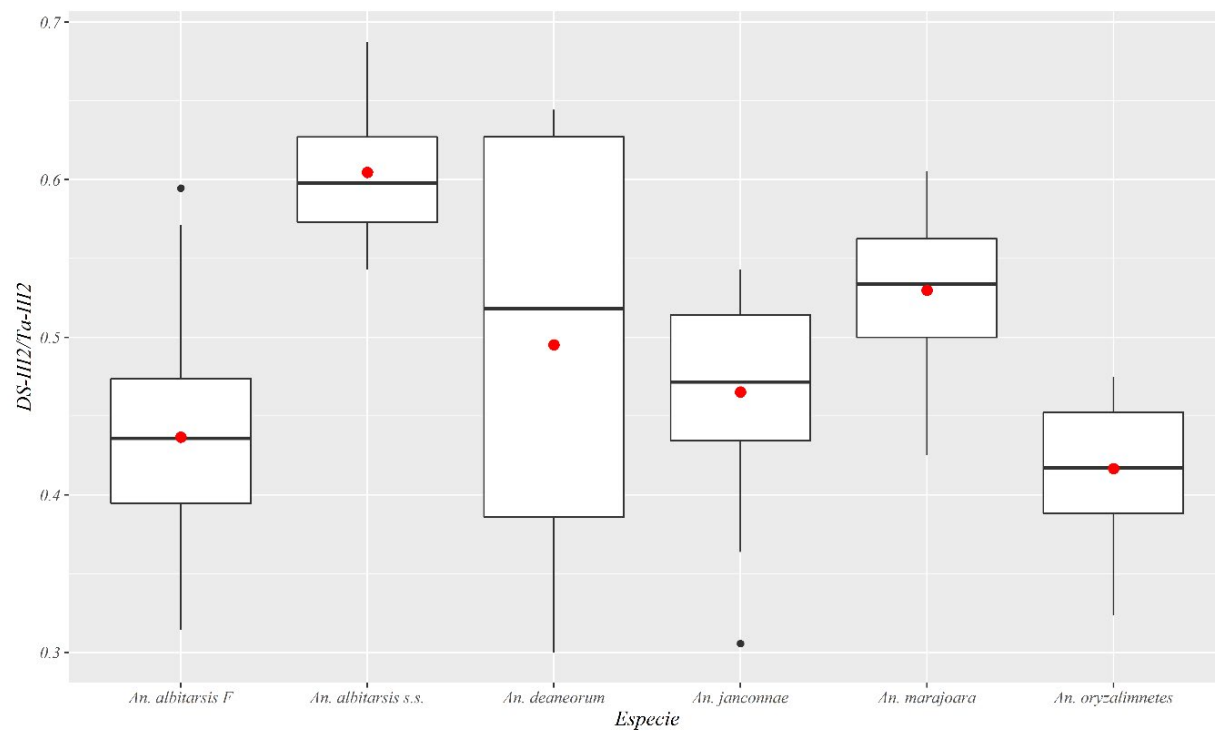


Figura 7B. *Boxplots* para la razón DS-III2/Ta-III2 para las especies del complejo *Anopheles albitarsis*.

Tabla 3. Estadísticas descriptivas de la razón longitud de la mancha prehumeral oscura (PHD) sobre la vena Costa del ala dividida entre la longitud de la mancha humeral clara (HP) (PHD/HP) para las especies del complejo *Anopheles albitarsis*.

Especie	N	Media*	SD	SE	Min.	Max.
<i>A. albitarsis</i> F	126	0,4741 ^{a, b}	0,1667	0,01485	0,2	0,8333
<i>A. albitarsis</i>	6	0,2304 ^c	0,1464	0,07321	0,1	0,4286
<i>A. deaneorum</i>	4	0,4343	0,2442	0,1221	0,1818	0,7143
<i>A. janconnae</i>	24	0,6281 ^{a, c, e}	0,2207	0,04505	0,3333	1,333
<i>A. marajoara</i>	9	0,253 ^{b, d, e}	0,1265	0,04217	0,1	0,4286
<i>A. oryzalimnetes</i>	10	0,4594 ^d	0,214	0,06766	0,125	0,6667

* Diferencias estadísticamente significativas al 5%. Pares de especies con medias seguidas de letras iguales presentan diferencias estadísticamente significativas. Significancia: a, d < 0,05; b, c < 0,001; e < 0,0001.

Tabla 4. Estadísticas descriptivas para la razón longitud de la mancha oscura proximal del tarsómero posterior 2 (DS-III2) dividido entre la longitud del tarsómero posterior 2 (Ta-III2) (DS-III2 /Ta-III2) de cinco poblaciones de *Anopheles albitarsis* F de Venezuela.

Población	N	Media*	SD	SE	Min.	Max.
Calabozo	38	0,4412 ^a	0,0495	0,0080	0,3214	0,5250
Jubillal	15	0,3937 ^{a, b}	0,0506	0,0131	0,3143	0,4688
Las Cristinas	29	0,4291 ^c	0,0433	0,0080	0,3571	0,5000
San Rafael	18	0,4771 ^{b, c}	0,0676	0,0159	0,3243	0,5946
Tumeremo	21	0,4343	0,0500	0,0109	0,3611	0,5588

* Diferencias estadísticamente significativas al 5%. Pares de especies con medias seguidas de letras iguales presentan diferencias estadísticamente significativas. Significancia: a, c < 0,05; b < 0,0001.

Tabla 5. Estadísticas descriptivas de la razón longitud de la mancha oscura proximal del tarsómero posterior 2 (DS-III2) dividido entre la longitud del tarsómero posterior 2 (Ta-III2) (DS-III2 /Ta-III2) para las especies del complejo *Anopheles albitarsis*.

Especie	N	Media*	SD	SE	Min.	Max.
<i>A. albitarsis</i> F	121	0,4365 ^{a, b}	0,0553	0,0050	0,3143	0,5946
<i>A. albitarsis</i>	6	0,6046 ^{a, c, d}	0,0513	0,0209	0,5429	0,6875
<i>A. deaneorum</i>	10	0,4167	0,0477	0,0151	0,3235	0,4750
<i>A. janconnae</i>	4	0,4952 ^c	0,1662	0,0831	0,3000	0,6444
<i>A. marajoara</i>	22	0,4652 ^{b, e}	0,0628	0,0134	0,3056	0,5429
<i>A. oryzalimnetes</i>	10	0,5299 ^{d, e}	0,0519	0,0164	0,4250	0,6053

* Diferencias estadísticamente significativas al 5%. Pares de especies con medias seguidas de letras iguales presentan diferencias estadísticamente significativas. Significancia: e < 0,01; a, b, c, d < 0,0001.

Venezuela (Rubio-Palis *et al.* 2003), lo cual es relevante para la identificación de esta especie. Además, resultado útil para separar las especies del Complejo Albitarsis ($p < 0,0001$) (Tabla 5, Figura 8), a excepción de *A. deaneorum*. Sin embargo, esta especie no se encuentra en el norte de Sur América, y su distribución está limitada a los estados brasileros de Mato Grosso, Rondônia y Paraná (Ruíz-López *et al.* 2012). Con base en los rangos de la razón $DS-III_2/Ta-III_2$ reportados por Motoki *et al.* (2009), la clave de Sallum *et al.* (2020) es poco precisa para la separación de las especies del Complejo indicando que en *A. marajoara*, *A. janconnae* y *A. oryzalimnetes* la razón $DS-III_2/Ta-III_2$ es $\leq 0,5$ y algunas veces $\geq 0,63$; mientras en *A. deaneorum* y *A. albitarsis* el rango de esta razón es $0,5 - 0,9$. Estas dos especies se pueden separar por la presencia en *A. deaneorum* de escamas apicales conspicuas en el tarsómero posterior 1 (Ta-III₁) y la presencia de penachos de escamas en los terga abdominales IV al VII; mientras que en *A. albitarsis* el Ta-III₁ no presenta escamas conspicuas y los penachos de escamas en los terga abdominales están presentes en los segmentos III al VII.

El presente trabajo confirma la ausencia de caracteres diagnósticos en las alas de machos y contribuye con caracteres diagnósticos encontrados en alas y patas posteriores para identificar las hembras de *A. albitarsis* F, importante vector de los parásitos maláricos tanto en Venezuela (Abou Orm *et al.* 2017, Moreno *et al.* 2009, Rubio-Palis 1994, Rubio-Palis *et al.* 1992) como en Colombia (Jiménez *et al.* 2014). Sin embargo, es fundamental realizar la descripción formal de esta especie incluyendo todos los estadios, así como establecer su distribución geográfica y profundizar estudios filogenéticos.

AGRADECIMIENTOS

A Helena Brochero, en cuyo laboratorio de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, se realizó parte de este estudio y a su estudiante de entonces, Miguel Pacheco, por su apoyo y discusión relevante para la estandarización de la metodología. Profundo agradecimiento a Richard Wilkerson, por su gentil invitación (YRP) a visitar el WRBU y poner a disposición las colecciones de *Anopheles* spp.; a Jim y David Pecor por su apoyo en la realización de parte de este estudio en el WRBU.

Literatura Citada

- ABOU ORM S, MORENO JE, CARROZZA M, ACEVEDO P, HERRERA F. 2017. Tasas de infección de *Plasmodium* spp. para algunos *Anopheles* spp. del municipio Sifontes, Estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 57: 17-25.
- BROCHERO HL, LI C, WILKERSON RC. 2007. A newly recognized species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* complex (Diptera: Culicidae) from Puerto Carreño, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(6): 1113-7.
- FISH D. 1985. An analysis of adult size variation within natural mosquito populations. En: Lounibos LP, Rey JR, Frank JH (editores). *Ecology of mosquitoes: proceedings of a workshop*. Florida Medical Entomology Laboratory, Vero Beach, Florida, USA. p 419-429.
- FOLEY DH, LINTON YM, RUÍZ-LÓPEZ JF, CONN JE, SALLUM MA, PÓVOA MM, *et al.* 2014. Geographic distribution, evolution, and disease importance of species within the Neotropical *Anopheles albitarsis* Group (Diptera, Culicidae). *Journal of Vector Ecology*, 39(1): 168-81. DOI: 10.1111/j.1948-7134.2014.12084.x.
- GÓMEZ G, JARAMILLO L, CORREA MM. 2013. Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the Albitarsis Complex from Colombia. *Molecular Ecology Resources*, 13(6): 1082-92. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.07.028.
- GONZÁLEZ R, CARREJO NS. 2009. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. 2nd ed. Universidad del Valle, Cali, Colombia. 260 p. DOI: 10.2307/j.ctv14jx88t.
- GONZÁLEZ OBANDO R, CÁRDENAS HENAO H, MARÍN-LONDOÑO OA. 2021. Efecto de la temperatura en la expresión fenotípica de caracteres de las manchas costales de *Nyssorhynchus triannulatus* (Diptera: Culicidae: Anophelinae). *Revista Colombiana de Entomología*, 47(1): e8456. DOI: 10/25100/socolen.v47il.8456.
- GRILLET ME, MORENO JE, HERNÁNDEZ JV, VINCENTI-GONZÁLEZ MF, NOYA O, TAMI A, *et al.* 2021. Malaria in Southern Venezuela: The Hottest Hotspot in Latin America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(1):e0008211. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008211.
- GUTIÉRREZ LA, ORREGO LM, GÓMEZ GF, LÓPEZ A, LUCKHART S, CONN JE, *et al.* 2010. A new mtDNA COI gene lineage closely related to *Anopheles janconnae* of the Albitarsis Complex in the Caribbean region of Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8): 1019-25.
- JIMÉNEZ P, CONN JE, WIRTZ R, BROCHERO H. 2012. *Anopheles* (Diptera: Culicidae) vectores de malaria en el municipio de Puerto Carreño, Vichada, Colombia. *Biomédica*, 32(Suppl 1): 13-21.

- doi: 10.1590/S0120-41572012000500003.
- KRZYWINSKI J, LI C, MORRIS M, CONN JE, LIMA JB, PÓVOA MM, *et al.* 2011. Analysis of the evolutionary forces shaping mitochondrial genomes of a Neotropical malaria vector complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(3): 469-77. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.01.003.
- MORENO JE, RUBIO-PALIS Y, PÁEZ E, PÉREZ E, SÁNCHEZ V, VACCARI E. 2009. Malaria entomological inoculation rates in gold mining areas of southern Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5):764-768.
- MORENO JE, RUBIO-PALIS Y, MARTÍNEZ AR, ACEVEDO P. 2014. Evolución espacial y temporal de la malaria en el municipio Sifontes del estado Bolívar, Venezuela. 1980-2013. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 54(2):236-249.
- MORENO JE, RUBIO-PALIS Y, SÁNCHEZ V, MARTÍNEZ A. 2015. Fluctuación poblacional y hábitat larval de anofelinos en el municipio Sifontes, estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 55(1): 52-68.
- MOTOKI MT, WILKERSON RC, SALLUM MAM. 2009. The *Anopheles albitarsis* complex with therecognition of *Anopheles oryzalimnetes* Wilkerson and Motoki, n. sp. and *Anopheles janconnae* Wilkerson and Sallum, n. sp. (Diptera: Culicidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 823-50. DOI: 10.1590/s0074-02762009000600004.
- MOTOKI MT, LINTON YM, CONN JE, RUÍZ-LÓPEZ F, WILKERSON RC. 2021. Phylogenetic Network of Mitochondrial COI Gene Sequences Distinguishes 10 Taxa Within the Neotropical Albitarsis Group (Diptera: Culicidae), Confirming the Separate Species Status of *Anopheles albitarsis* H (Diptera: Culicidae) and Revealing a Novel Lineage, *Anopheles albitarsis* J. *Journal of Medical Entomology*, 58(2): 599–607. DOI: 10.1093/jme/tjaa211.
- PACHECO-GÓMEZ MA, GONZÁLEZ-OBANDO R, BROCHERO H. 2018. Morphometric variations of two populations of *Anopheles albitarsis* F (Diptera: Culicidae) in the Orinoquia region, Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 66(2): 201-208. DOI: 10.15446/revfacmed.v66n2.61071.
- R CORE TEAM. 2020. R: a language and environment for statistical computing. Viena, Austria. <https://www.R-project.org/>
- ROSA-FREITAS MG, DEANE LM, MOMEN H. 1990. A morphological, isoenzymatic and behavioural study of ten populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* Lynch-Arribáizaga, 1878 (Diptera: Culicidae) including from the type-locality - Baradero, Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85: 275-89. DOI: 10.1590/S0074-02761990000300004
- RUBIO-PALIS Y. 1994. Variation of the vectorial capacity of some anophelines in western Venezuela. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50(4): 420-4. doi: 10.4269/ajtmh.1994.50.420.
- RUBIO-PALIS Y. 1998. Caracterización morfológica de poblaciones del vector de malaria *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* Root (Diptera: Culicidae) del sur de Venezuela. *Boletín de Entomología Venezolana*, 13: 141-72.
- RUBIO-PALIS Y. 2000. *Anopheles (Nyssorhynchus)* de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Maracay, Venezuela: Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental “Dr. Arnoldo Gabaldon”. Descargado de: www.iaes.edu.ve/index.php/centro-de-descargas/viewcategory/3-libros-y-publicaciones.
- RUBIO-PALIS Y. 2015. Manual de métodos para capturar anofelinos y otros mosquitos (Diptera: Culicidae). Instituto de Altos Estudios “Dr. Arnoldo Gabaldon”, MPP Salud. Maracay, Venezuela. Descargado de: <http://www.iaes.edu.ve/index.php/centro-de-descargas/viewcategory/3-libros-y-publicaciones>.
- RUBIO-PALIS Y, WILKERSON R, GUZMÁN H. 2003. Morphological characters of adult *Anopheles (Nyssorhynchus) marajoara* in Venezuela. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 19(2): 107-14.
- RUBIO-PALIS Y, MORENO JE, BEVILACQUA M, MEDINA D, MARTÍNEZ A, CÁRDENAS L, *et al.* 2010. Caracterización ecológica de los anofelinos y otros culícidos en territorio indígena del Bajo Caura, estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50(1): 95-107.
- RUBIO-PALIS Y, RUÍZ-LÓPEZ F, GUZMÁN H, SÁNCHEZ V, MORENO J, ESTRADA Y, *et al.* 2013a. Primer registro de *Anopheles (Nyssorhynchus) oswaldoi* B y *Anopheles (Nys.) albitarsis* F en la cuenca del río Caura, Estado Bolívar, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53: 68-72.
- RUBIO-PALIS Y, BEVILACQUA M, MEDINA DA, MORENO JE, CÁRDENAS L, SÁNCHEZ V, *et al.* 2013b. Malaria entomological risk factors in relation to land cover in the Lower Caura River Basin, Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108: 220-228.
- RUBIO-PALIS Y, WIRTZ RA, CURTIS CF. 1992. Malaria entomological inoculation rates in western Venezuela. *Acta Tropica*, 52(2-3): 167-74. doi: 10.1016/0001-706x(92)90033-t.
- RUÍZ-LÓPEZ F, WILKERSON RC, CONN JE, MCKEON SN, LEVIN DM, QUIÑONES ML, *et al.* 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites and Vectors*, 5: 44. DOI: 10.1186/1756-3305-5-44.

- SALLUM MAM, GONZÁLEZ OBANDO R, CARREJO N, WILKERSON RC. 2020. Identification keys to the *Anopheles* mosquitoes of South America (Diptera: Culicidae). IV. Adult females. *Parasites and Vectors*, 13:584. DOI:10.1186/s1371-020-04301-0.
- SCHNEIDER JR, MORRISON AC, ASTETE H, SCOTT TW, WILSON ML. 2004. Adult size and distribution of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) associated with larval habitats in Iquitos, Peru. *Journal of Medical Entomology*, 41(4): 634–642.
- SOUZA RS, VIRGINIO F, RIBACK TIS, SUESDEK L, BARUFI JB, GENTA FA. 2019. Microorganism-Based Larval Diets Affect Mosquito Development, Size and Nutritional Reserves in the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Frontiers in Physiology*, 10: 152. DOI: 10.3389/fphys.2019.00152.
- SWIFT ML. 1997. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 37(2): 411-412. DOI: 10.1021/ci960402j.
- VAN SCHOOR T, KELLY ET, TAM N, ATTARDO GM. 2020. Impacts of Dietary Nutritional Composition on Larval Development and Adult Body Composition in the Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*). *Insects*, 11: 535. DOI:10.3390/insects11080535.
- WALLACE JR, MERRITT RW. 1999. Influence of microclimate, food, and predation on *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) growth and development rates, survivorship, and adult size in a Michigan Pond. *Environmental Entomology*, 28(2): 233–239.
- WILKERSON RC, PEYTON EL. 1990. Standardized Nomenclature for the Costa Wing Spots of the Genus *Anopheles* and Other Spotted-Wing Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 27(2): 207-224.
- ZÚÑIGA MA, RUBIO-PALIS Y, BROCHERO H. 2021. Updating the bionomy and geographical distribution of *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* F: A vector of malaria parasites in northern South America. *PLoS ONE*, 16(6): e0253230. <https://DOI.org/10.1371/journal.pone.0253230> E