

**Taxonomía, distribución e importancia médica de mosquitos (Diptera:
Culicidae) del género *Trichoprosopon* Theobald, 1901 y del subgénero
Kerteszia Theobald, 1905 de Colombia**

Juan David Suaza Vasco, I.A., M. Sc.

Tesis presentada como requisito para optar al título de
Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas

Directora

Sandra Uribe Soto, PhD., Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín

Codirector

Guillermo Rúa Uribe, PhD., Universidad de Antioquia

Corporación Académica en Ciencias Básicas Biomédicas
Universidad de Antioquia
Medellín
2019



Trabajo de investigación realizado con la participación de:

Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention-CDC, Atlanta, USA.

Grupo de Investigación en Entomología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Comité Tutorial

Sandra Uribe Soto, MSc., PhD., Profesora titular e investigadora. Coordinadora del Grupo de Investigación en Sistemática Molecular (GSMUN) de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Guillermo L. Rúa-Uribe, MSc., PhD. Profesor e investigador. Coordinador del Grupo de Entomología Médica (GEM) de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Juan Carlos Gallego Gómez, PhD. Profesor e investigador de Microbiología y Parasitología. Coordinador del Grupo de Medicina Molecular y de Traslación. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Charles Porter, MSc., PhD. Investigador en Entomología. Division of Parasitic Diseases and Malaria. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA.

Prefacio

El presente documento está escrito por capítulos y se ha organizado de forma que en los primeros y después de un resumen muy general, se realice una contextualización sobre el trabajo y la importancia del mismo en relación con los vacíos de conocimiento sobre los grupos de los mosquitos abordados, principalmente en Colombia, pero también en el ámbito internacional. Esto incluye la introducción y las generalidades sobre los mosquitos (Diptera: Culicidae) y en particular sobre los grupos de interés.

Seguidamente se explicitan los objetivos y la metodología generales y posteriormente se detallan los resultados en formato artículo.

Los capítulos de resultados incluyen inicialmente aquellos relacionados con el género *Trichoprosopon* y de forma seguida aquellos relacionados con *Anopheles (Kerteszia)* spp.

Los capítulos siguientes incluyen resultados sobre ambos géneros en mosquitos de altura y otros resultados complementarios relacionados con mosquitos y su relación con la transmisión de arbovirus.

En total se incluyen 5 artículos próximos a someter como primer autor y 12 artículos ya publicados la mayoría de los cuales incluyen resultados originales y contribuciones significativas derivadas del presente trabajo de tesis o trabajos complementarios relacionados estrechamente con el tema principal.

Tabla de contenido v

Prefacio..... iv

Resumen viii

Capítulo 1

Introducción general: Descripción e importancia de los grupos taxonómicos del orden Diptera abordados en el presente estudio 11

1. Introducción 12

1.1. Mosquitos: generalidades e importancia..... 14

1.2. Subgénero *Anopheles (Kerteszia)* 16

1.3. Género *Trichoprosopon* 17

2. Objetivos 19

2.1. Objetivo General 19

2.2. Objetivos específicos 19

3. Metodología 20

3.1. Muestreo de mosquitos 20

3.2. Colección y montaje del material biológico procedente de campo 21

3.3. Identificación taxonómica y variabilidad molecular 21

Capítulo 2

Género *Trichoprosopon* 32

1. The Sabethines of Northern Andean coffee-growing regions of Colombia 32

2. Taxonomía, bionomía, distribución geográfica e importancia médica del género *Trichoprosopon* Theobald, 1901 (Diptera: Culicidae) en Colombia y otras regiones de Centro y Suramérica..... 44

3. Lista de distribución del género Neotropical *Trichoprosopon* Theobald, 1901 67

4. Nueva especie de *Trichoprosopon* en Colombia 81

5. Género *Trichoprosopon*: Análisis desde la perspectiva de la secuencia del código genético de barras *cox1*95

Capítulo 3

Subgénero *Kerteszia* del género *Anopheles*.....111

1. Actualización de la información sobre registros de la presencia *Anopheles* (*Kerteszia*) spp en Colombia.....111
2. *Anopheles* (*Kerteszia*) (Diptera: Culicidae) desde la perspectiva de la secuencia código de barras de ADN.....125
3. *Anopheles* (*Kerteszia*) *boliviensis* en un bosque altoandino del municipio de Jardín (Antioquia-Colombia): Registro y análisis con base en secuencias de ADN mitocondrial141
4. Phylogenetic signal at the Cytb-SertRNA-IG1-ND1 mitochondrial region in *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913157
5. Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia.....171
6. Intraspecific phylogeny of *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* Howard, Dyar & Knab 1913, based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes186

Capítulo 4

Presencia y análisis de los grupos de interés en ecosistemas de altura y en relación con otros grupos de Diptera: Culicidae196

1. Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia.....196
2. Mosquito fauna (Diptera: Culicidae) of high Andean mountain ecosystems in Colombia.....207
3. Molecular operational taxonomic units of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in high Andean mountain ecosystems of Antioquia, Colombia.....224

Capítulo 5

Resultados derivados de trabajos complementarios relacionados con Diptera (Culicidae) y su relación con la transmisión de arbovirus.....243

1. Molecular detection of Eastern Equine Encephalitis virus in mosquitoes from La Pintada (Antioquia)243
2. Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean.....252
3. Sinu virus, a novel and divergent orthomyxovirus related to members of the genus *Thogotovirus* isolated from mosquitoes in Colombia264
4. Infección de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) con el genotipo asiático-americano del virus del dengue serotipo 2 en Medellín y su posible papel como vector del dengue en Colombia292

Material suplementario I302

Material suplementario II.....329

Material suplementario III334

RESUMEN

Los culícidos constituyen un grupo de gran importancia biológica no solo por su capacidad de transmitir parásitos y patógenos al hombre y a los animales, sino también por su representatividad como indicadores de la calidad de los ecosistemas, lo cual a su vez se relaciona con la especificidad de algunos de sus hábitats larvarios y con los requerimientos particulares para la cría y desarrollo de sus estados inmaduros y adultos.

En el presente trabajo se revisó la taxonomía y distribución geográfica de mosquitos (Diptera: Culicidae) incluidos en dos grupos de común ocurrencia en hábitats fitotelmata, los cuales son de importancia médica, relacionada principalmente con su potencial para transmitir arbovirus de importancia en la salud humana y veterinaria. Estos grupos son el género *Trichoprosopon* (subfamilia Culicinae, tribu Sabethini) relacionado con la transmisión potencial de al menos 11 arbovirus y el subgénero *Kerteszia* (subfamilia Anophelinae, género *Anopheles*). En este último grupo, la especie *Anopheles neivai*, además de relacionarse con la transmisión potencial de al menos 2 arbovirus, es reconocida como vector secundario de malaria en el pacífico colombiano y su estudio ha cobrado importancia en relación con aspectos epidemiológicos y de control. Otras especies como *An. pholidotus* y *An. boliviensis* son también consideradas de importancia médica y en particular en Colombia se han asociado con la transmisión de malaria.

En relación con el género *Trichoprosopon* se revisó la sistemática y taxonomía de la tribu Sabethini a la cual pertenece y se actualizaron los datos sobre la presencia y distribución de los géneros de esta tribu. Para el género en particular, se estudiaron las especies encontradas, dos de ellas nuevas para la ciencia, con base en caracteres morfológicos de los estados inmaduros y adultos y se actualizaron los datos sobre la presencia y distribución, así como sobre el uso de sitios de desarrollo de inmaduros o criaderos naturales. También se encontraron y estudiaron 3 especies del género *Jhonbelkinia* un género descrito a partir de *Trichoprosopon* con base en algunas diferencias morfológicas. La presencia del género en ecosistemas de altura fue registrada con énfasis en zonas cafeteras con nuevos registros para el país. La variabilidad a nivel molecular y el uso de la secuencia código de barras para separar las especies de *Trichoprosopon* fueron también estudiadas validando una vez más el uso de esta secuencia como herramienta en estudios de entomología médica y en particular en este grupo de interés para el cual no se encontraba disponible información a este nivel.

Para el subgénero *Kerteszia* del género *Anopheles*, se actualizó la lista de especies para el país con base en la literatura disponible y el trabajo de campo encontrándose 7 especies registradas en Colombia de las cuales 5 fueron colectadas en campo y revisadas taxonómicamente. Se realizó la revisión con base en caracteres morfológicos y moleculares en las especies disponibles y en este

último aspecto, la secuencia código genético de barras *cox1*, con base en la cual e ix incluyendo secuencias disponibles en las bases de datos, se evaluó la separación nivel de especie. También se estudió la región mitocondrial Cytb-SertRNA-IG1-ND1, en relación con la variabilidad y separación entre las especies del complejo *An. boliviensis*. El análisis con base en las secuencias de ADN permitió separar claramente las tres especies del complejo y reportar por primera vez su coocurrencia en el departamento de Antioquia en ecosistemas de altura.

En cuanto a la especie *An. neivai*, se revisó material de la localidad tipo en Panamá y en Charambirá, en el litoral San Juan, Chocó, localidad donde se registra para Colombia la mayor importancia epidemiológica como vector de malaria. El material fue estudiado en términos de variabilidad molecular junto con material procedente de otras regiones de Colombia y de su distribución geográfica. En este contexto, los datos de variabilidad molecular de *An. neivai* derivados del presente estudio y de trabajos complementarios del macroproyecto de investigación que lo incluye, permiten sugerir que *An. neivai* no constituye un complejo de especies en Colombia, pero sí aparece como una especie ampliamente polimórfica, con linajes moleculares diferenciables, aspecto que podría estar relacionado con una baja dispersión y muy seguramente con aspectos biogeográficos de gran interés que valdría la pena considerar.

En este estudio, se encontró que la secuencia código genético de barras *cox1*, puede representar una herramienta valiosa para la separación de las especies del subgénero y de el o los complejos de especies existentes en los grupos de interés. Así mismo, y como resultado de este estudio, se considera que los criaderos usados y la procedencia geográfica de los individuos aportan elementos de gran importancia, siendo la taxonomía integrativa una importante opción que vale la pena explorar con mayor profundidad para este grupo.

Capítulo 1

Introducción general: Descripción e importancia de los grupos taxonómicos del orden Diptera abordados en el presente estudio

1. Introducción

Durante el desarrollo de estrategias conducidas a la prevención y control de enfermedades zoonóticas transmitidas por artrópodos, es fundamental el conocimiento de la taxonomía, biología, ecología y distribución geográfica de las especies vectores (Mathews, 2009; Fuller *et al.*, 2016; Welburn *et al.*, 2015). Para el caso específico de insectos, éste es sin duda un componente fundamental para una vigilancia entomológica adecuada en los programas actuales que incluyen por lo general, sistemas de información geográfica y vigilancia epidemiológica (Grogan *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015).

Los objetivos de la vigilancia entomológica en un sentido amplio, incluyen conocer aspectos como los cambios en la distribución geográfica de los insectos vectores a partir de estudios de presencia e identificación de las especies, fluctuaciones en las densidades de las poblaciones, precisar los sitios de desarrollo de las formas inmaduras, actualizar los mapas de distribución espacial incluyendo la presencia de nuevas especies o cambios en el paisaje y poder realizar el rastreo de los agentes etiológicos de las enfermedades que los vectores transmiten (ej. virus y otros parásitos y patógenos) (Beaty, 1996; Di Giallonardo *et al.*, 2016; Hoyos *et al.*, 2015; Hoyos *et al.*, 2015a; Martínez *et al.*, 2017; Moon *et al.*, 2018; 2005; Sallam *et al.*, 2016).

En la mayoría de países del mundo y en particular en los latinoamericanos, los programas de vigilancia entomológica y control de vectores están establecidos solamente para algunas especies de insectos, incluyendo mosquitos transmisores de enfermedades como el dengue o la malaria, y han sido enfocados a las especies consideradas como vectores primarios. Lo anterior trae como consecuencia, algunas dificultades por la presencia de otras especies vectores, las cuales sumadas a problemas como la resistencia a los insecticidas, hacen complejo el panorama para la interrupción de la transmisión desde el insecto vector (Méndez *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007; Cáceres *et al.*, 2011; Dusfour *et al.*, 2011; Dick *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2017).

En el contexto de las enfermedades conocidas como emergentes y reemergentes (Morse 1995) cuya aparición y efectos en la salud humana y animal se relacionan también con actividades antrópicas, cobra relevancia la realización de estudios básicos, principalmente de taxonomía y distribución de especies consideradas como vectores secundarios o de aquellas cuyo rol en la transmisión de enfermedades no es tan bien conocido, pero para las cuales existen evidencias o hallazgos que podrían ser significativas en los escenarios epidemiológicos actuales y futuros (Alimi *et al.*, 2015; Altamiranda *et al.*, 2017).

Conocer la identidad y distribución de los insectos vectores y sus cambios en el tiempo es de significativa importancia, ya que son los vectores los que focalizan la transmisión y determinan

muchas de las características epidemiológicas de la misma (Moffett *et al.*, 2007; Masuoka *et al.*, 2010). En este contexto cobran vigencia los estudios de sistemática, que permitan estudiar los insectos potencialmente vectores desde una perspectiva taxonómica. Esto es especialmente importante para aquellos vectores menos conocidos o con identidades poco precisas o no descritas, para los cuales, la revisión de los caracteres diagnósticos de las especies, el estudio de los estados inmaduros y la actualización sobre la distribución espacial permite avanzar en su conocimiento desde una perspectiva más integral; es decir, en aspectos que son básicos, pero que poseen implicaciones sobre la epidemiología y control de las enfermedades que transmiten (Fuller *et al.*, 2016).

En el presente estudio se investigaron dos grupos de especies de mosquitos, subgénero *Kerteszia* del género *Anopheles* y género *Trichoprosopon* de la tribu Sabethini cuyos sitios de cría son conocidos como fitotelmata, un tipo de criadero cuyo uso y características, han sido pobremente estudiados en Colombia, donde se ha investigado principalmente criaderos artificiales para la especie *Aedes aegypti*.

Algunas de las especies de los grupos objeto de investigación en el presente estudio han sido relacionados con molestias ocasionadas al hombre y los animales por las picaduras dado su carácter antropofílico y zoofílico, pero además han sido encontradas infectadas con parásitos de importancia en la salud humana o animal o incriminadas como posibles vectores o como vectores secundarios (Roca, 1944; Lee & Sanmartín, 1967; Montoya *et al.*, 2011). Los cambios en las dinámicas de los ecosistemas y de las coberturas del paisaje relacionadas con la expansión de la frontera agrícola, el ecoturismo y las grandes obras de infraestructura, han influenciado el contacto del hombre con estas especies por su intrusión a las zonas boscosas donde ellas habitan, generando un riesgo que es necesario considerar (Barajas *et al.*, 2013; Ceretti *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2016; Castro, 2017;).

En este sentido, la falta de conocimiento de muchas de las autoridades de salud y ambientales sobre la presencia e importancia de algunas especies de estos grupos en zonas geográficas determinadas, los ecosistemas a los cuales están asociadas y como pueden influenciar la salud. Adicionalmente, algunas de las especies estudiadas, se consideran mosquitos indicadores de la calidad de los ecosistemas (Ferreira, 2012; Biassi *et al.*, 2015; Paula *et al.*, 2015) y como resultado del presente trabajo creemos que su estudio es de importancia en el contexto mismo de la salud de los ecosistemas.

La especie *Anopheles neivai*, incluida en el subgénero *Kerteszia* del género *Anopheles*, es considerada como vector secundario de malaria en el Chocó, aunque hay creciente evidencia de que su papel podría haber cambiado a primario (Quiñones *et al.*, 2006; Ruíz *et al.*, 2012; Sinka *et al.*, 2010; Ahumada *et al.*, 2013; Ahumada *et al.*, 2016; López *et al.*, 2019). La malaria es considerada una enfermedad desatendida en Colombia (OPS, 2011) y que presenta condiciones y situaciones endemo-epidémicas, representadas por endemias focalizadas y escenarios vulnerables

de transmisión (Minsalud, 2013). Esta especie también se considera importante en relación con la transmisión potencial de arbovirus como Guaroa (Lee & Sanmartín, 1967) y Anopheles B (Roca, 1944) pero a la fecha no hay estudios concluyentes en Colombia.

En este estudio también se incluyó la revisión de las especies del género *Trichoprosopon* (tribu Sabethini), las cuales han sido muy poco estudiadas en el país, pero que pueden jugar un papel importante en la circulación de virus como Encefalitis de San Luis y *Wyeomyia* (Hastriter, 1998; Venegas *et al.*, 2012). Muchas de sus especies hacen parte de complejos de especies que presentan gran dificultad taxonómica y su presencia y distribución han sido seguramente subestimadas en Colombia.

En relación con el subgénero *Kerteszia*, se consideró preciso realizar una revisión de los caracteres taxonómicos que definen las especies y revisar las claves taxonómicas y su utilidad, dadas las confusiones para su identificación, evidentes en algunos trabajos de incriminación vectorial (Harbach *et al.*, 2013; López *et al.*, 2016). Para el grupo “*boliviensis*” de este subgénero y partiendo del desconocimiento casi total de éste en el país, se realizó un trabajo que permitió evaluar la variabilidad morfológica y molecular y revisar el estatus del grupo.

Las preguntas de investigación en el caso de la tribu Sabethini se relacionaron con el número de especies y en particular del género *Trichoprosopon*, el uso de criaderos previa revisión y definición de los caracteres taxonómicos de las especies, así como las relaciones entre las especies encontradas y la actualización de su distribución para el país.

Durante el estudio taxonómico en ambos grupos de mosquitos, adicional al uso de caracteres morfológicos, se utilizaron herramientas moleculares para la obtención de secuencias de ADN propuestas como códigos de barra genéticos. El código de barras se ha propuesto como una herramienta útil para incrementar la rapidez, objetividad y precisión en la diferenciación de especies (Min and Hickey, 2007; Hajibabaei *et al.* 2006; Pfenninger *et al.* 2007). Lo anterior aplica en los estudios de identificación de especies de mosquitos (Diptera: Culicidae), los cuales son objeto de utilización del código de barras genético debido a la importancia biomédica de muchas de sus especies y al previo conocimiento de taxas bien representados en colecciones de museos (Linton, 2005; Cywinska *et al.* 2006).

La ausencia de colecciones taxonómicas y el mal estado de las pocas existentes en Colombia señaló sin duda la necesidad de crear colecciones de referencia relacionadas con estudios de campo que permitiera a su vez, conocer aspectos básicos de la taxonomía y sistemática de los grupos con repercusiones importantes en la ecología y en importancia epidemiológica de los mismos.

1.1. Mosquitos: generalidades e importancia

Los mosquitos (Diptera: Culicidae) son considerados el grupo más importante de artrópodos de importancia médica y veterinaria. Conforman un importante y reconocido grupo con especies hematófagas, las cuales han sido ampliamente explotadas por parásitos llevados de un hospedero a otro, con diferentes alternativas de supervivencia (Beatty & Marquardt, 1996). A partir del siglo XIX se plantearon las primeras hipótesis sobre el papel de los Culicidae en la transmisión de infecciones. Finlay (1881), propone los mosquitos como organismos vinculados en la transmisión de fiebre amarilla. Mas tarde, las observaciones de Manson (1879) comprueban que los culícidos son transmisores de filariasis linfática (Forattini, 2002). Enfermedades transmitidas por mosquitos, como la malaria y el dengue, han cobrado mayor importancia en los últimos años en relación con las modificaciones del ambiente y la expansión de la frontera agrícola (Weissenbacher *et al.*, 1998). Más recientemente enfermedades denominadas emergentes y reemergentes (Morse, 1995), muchas de ellas transmitidas por mosquitos y entre las cuales se encuentran enfermedades causadas por agentes virales, han llamado la atención de autoridades de salud y ambientales, ya que se prevé que como resultado de las modificaciones antrópicas y el cambio climático, estas enfermedades podrían presentarse en formas inesperadas con consecuencias devastadoras para la salud (Perfecto *et al.*, 1997 ; Guhl, 2004; IPCC, 2007).

De acuerdo con la clasificación taxonómica actual, la familia Culicidae (Orden: Diptera) donde se encuentran todos los dípteros conocidos como “mosquitos” incluye dos subfamilias: Anophelinae y Culicinae, en un esquema de organización que comprende 11 tribus, 113 géneros y 3.563 especies alrededor del mundo (Harbach, 2013).

En cuanto a los arbovirus y su relación con los mosquitos vectores como los incluidos en el presente estudio, sin duda éstos representan un tema de investigación vigente y sobre el cual para Colombia hay aun relativamente poco conocimiento. Esto puede relacionarse con que históricamente se ha considerado de mayor relevancia el estudio en otros géneros como *Aedes* (Subfamilia Culicinae) y *Anopheles* (Subgéneros *Anopheles* y *Nyssorhynchus*). En particular las especies *Aedes (Stegomyia) aegypti* y *Aedes (Stegomyia) albopictus* han sido ampliamente estudiadas, siendo la primera, el vector reconocido del virus dengue y la segunda de importancia epidemiológica en relación con la transmisión potencial de diversos arbovirus incluyendo el dengue (Long *et al.*, 2011 ; Mavale *et al.*, 2012 ; Rúa *et al.*, 2012 ; Bargielowski *et al.*, 2015; Gómez *et al.*, 2017;).

Para el género *Anopheles*, los subgéneros *Anopheles* y *Nyssorhynchus* han sido los más estudiados, por su importancia en la transmisión de la malaria (Brochero *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2017; Lucumi *et al.*, 2011). Ambas enfermedades tienen un impacto significativo en la salud de los colombianos, pero además a nivel mundial (Gubler, 2002 ; Sachs & Malaney, 2002 ; Torres & Castro, 2007; Castañeda *et al.*, 2012; Shepard *et al.*, 2011; Vasilakis *et al.*, 2011).

Uno de los aspectos críticos en los programas de control de vectores es la correcta diferenciación de las especies, aspecto que define en gran medida los tipos, métodos y estrategias a implementar en un programa de manejo integrado o control de mosquitos vectores (González & Carrejo, 2009). También es primordial el conocimiento de la biología, ecología y distribución de las especies de mosquitos potencialmente vectores y en la actualidad teniendo como base este conocimiento, se puede acceder a herramientas informáticas y modelación de procesos y factores que permiten incluso predecir eventos y sucesos, patrones de distribución de los vectores y otros aspectos de gran importancia en la prevención y control (Guhl, 2004; Alimi *et al.*, 2015; Daniel *et al.*, 2016 ; Altamiranda *et al.*, 2017; Lausch *et al.*, 2015).

1.2. Subgénero *Anopheles (Kerteszia)*

En la región Neotropical, y en particular en Colombia, la malaria es una de las enfermedades más importantes. En el país hay 43 especies del género *Anopheles*, siendo tres especies consideradas como vectores principales y cuatro reconocidas como secundarios. Dentro de estas últimas, dos pertenecen al subgénero *Kerteszia*: *Anopheles pholidotus* y *Anopheles neivai*. Muchas de las especies de *Kerteszia* constituyen complejos de especies crípticas, morfológicamente similares, indistinguibles o con problemas taxonómicos (González & Carrejo, 2009). De las doce especies reconocidas, seis han sido encontradas infectadas con *Plasmodium* siendo efectiva su transmisión a humanos y especies animales (Lee & Sanmartín, 1967 ; Carvajal *et al.*, 1989; García, 1996; Rona *et al.*, 2009).

Al respecto, se ha encontrado hembras adultas de las especies *Anopheles cruzii*, *Anopheles neivai*, *Anopheles bellator*, *Anopheles boliviensis*, *Anopheles lepidotus* y *Anopheles homunculus*, infectadas en la naturaleza con protozoarios maláricos de *Plasmodium* spp. (Harbach, 2013; Zavortink, 1979). Las especies *Anopheles boliviensis* y *Anopheles neivai* han sido encontradas además infectadas naturalmente con arbovirus, incluyendo los virus Fiebre amarilla y Guaroa (De Rodaniche *et al.*, 1957; Lee & Sanmartín, 1967). Además, todas las especies del subgénero son consideradas con alto grado de antropofilia (Zavortink, 1979), siendo esta característica altamente relevante en algunas regiones de Brasil, Trinidad y Colombia, con reportes de casos de malaria endémica (Zavortink, 1979).

Una de las principales características ecológicas del subgénero, es la asociación que tienen sus especies con las bromelias (Poales: Bromeliaceae) (Forattini, 2002). Las hembras adultas ovipositan en las axilas foliares de las bromelias, donde se forman contenedores naturales de agua denominados fitotelmata, y se desarrollan los estados inmaduros del mosquito. Solo hay una excepción dentro de las especies de *Kerteszia* respecto a su asociación con las bromelias y la constituye la especie *Anopheles bambusicolus*. Dicha especie utiliza como criadero los entrenudos de bambú o guadua (Poales: Poaceae). Debido a la asociación de las especies de *Kerteszia* con las bromelias y a la importancia médica de algunas de sus especies, se ha implementado el uso del

término “malaria de las bromelias” ya que la bromelia juega un papel importante como hospedera de las formas inmaduras del vector (Zavortink, 1973).

Una de las dificultades para entender los patrones y dinámicas de transmisión por especies del subgénero *Kerteszia*, se relaciona con el hecho de que algunas son difíciles de identificar taxonómicamente, lo cual se debe principalmente a la ausencia de especialistas, descripciones incompletas, series tipo reducidas y asignación errónea de estructuras genitales de machos a especies diferentes (Gonzales & Carrejo, 2009). Además, los datos de distribución que se tienen en la actualidad, sugieren que existe confusión para diferenciarlas, incluso aquellas que han sido reconocidas previamente como especies.

En Colombia, uno de estos ejemplos lo constituye los registros de distribución de las especies *Anopheles boliviensis*, *Anopheles homunculus* y *Anopheles pholidotus* que incluyen un amplio rango de distribución desde la vertiente occidental de la cordillera occidental hasta la vertiente oriental de la cordillera oriental andina. Dicho patrón de distribución debe ser revisado y revaluado según algunos autores, debido a que las tres cordilleras andinas presentan barreras geográficas significativas - valles interandinos y las zonas de alta montaña - para especies de mosquitos como éstas (Stojanovich *et al.* 1966).

Otra de las especies del subgénero con dudosa distribución es *Anopheles neivai*, la cual ha sido reconocida como un vector secundario de malaria a lo largo de la costa pacífica de Colombia (Gutiérrez *et al.*, 2008). Los estados inmaduros han sido encontrados abundantemente en bromelias asociadas a manglares adyacentes de los bosques tropicales bajos del occidente del país (Naranjo *et al.*, 2014). Actualmente, se reconoce que esta especie posee un amplio rango de distribución desde Ecuador hasta el sur de México (Zavortink, 1973). En Colombia, se ha registrado en zonas de alta montaña en altitudes de 2300 msnm (Navarro *et al.*, 2010), sin embargo, la extensión de su distribución en el país, especialmente en zonas de alta elevación, permanece incierta. Algunos de los especímenes de la costa pacífica colombiana poseen caracteres morfológicos que sugieren una forma intermedia entre *Anopheles neivai* y *Anopheles homunculus* (González & Carrejo, 2009). Estas diferencias morfológicas sugieren que dos o más especies hermanas pueden estar representadas por dichas morfoespecies.

En cuanto a la distribución de *Anopheles boliviensis* en Colombia, se tienen registros a bajas elevaciones, sin embargo, la especie se ha reportado anteriormente como un mosquito de tierras altas (Navarro *et al.*, 2010). Otras especies del subgénero permanecen sin describir como se evidencia a partir de estudios preliminares en regiones orientales de los andes peruanos y venezolanos.

1.3. Género *Trichoprosopon*

Este género hace parte de la tribu Sabethini (subfamilia Culicinae) que incluye 423 especies reconocidas en catorce géneros. Los estados larvales de estos mosquitos están casi exclusivamente asociados a contenedores naturales de agua y muchos pueden requerir de una planta hospedadora específica (Forattini, 1965; Forattini *et al.*, 1993; Forget & Lebel, 2001). La mayoría de las hembras adultas de *Trichoprosopon* se alimentan sobre animales y algunas son antropofílicas (Forattini, 1965); sin embargo, se considera que los cambios de hábitos de fuente de ingesta sanguínea están altamente influenciados por las modificaciones de las condiciones naturales de los sitios de cría y la presencia del hombre en relación con la urbanización y el crecimiento de la frontera agrícola. Entre los Sabethini considerados de importancia en la salud pública, se encuentran los géneros *Limatus*, *Sabethes*, *Johnbelkinia*, *Trichoprosopon* y *Wyeomyia*, asociados con la transmisión de patógenos y en particular virus (Forattini, 1965; Forattini *et al.*, 1993; Forattini, 2002).

El género *Trichoprosopon* ha sido reclasificado y dividido en el año 1979 en cuatro nuevos géneros: *Trichoprosopon*, *Shannoniana*, *Runchomyia* y *Johnbelkinia* (Zavortink, 1979). *Trichoprosopon* se sugiere que consiste de cuatro complejos, cuya delimitación de especies es compleja por diferentes razones como carencia de estudio de los estados inmaduros, similitud de las especies en estado adulto y presencia de poblaciones alopátricas y simpátricas lo cual dificulta no solo la diferenciación de las especies, sino también la incriminación vectorial (Zavortink, 1981). A esto se suma la poca disponibilidad de especialistas en el grupo y en particular en países como Colombia.

Entre los complejos más importantes y objeto del presente estudio se encuentra *Trichoprosopon digitatum* s.l., que ha sido previamente reportado para Colombia, aunque muy poco estudiado. Este grupo está involucrado en la transmisión de virus como Bussuquara, Encefalitis de San Luis, *Wyeomyia* que afectan al hombre y animales respectivamente (Aitken *et al.*, 1968; Aitken *et al.*, 1968 a; Galindo *et al.*, 1964; Galindo *et al.*, 1966; Causey *et al.*, 1961). De la misma manera el complejo *Tr. pallidiventer*, asociado a la transmisión del virus *Wyeomyia* y Guama. Se prevé que, por las condiciones cambiantes del país en términos de actividades antrópicas y efectos ambientales y climáticos, epidemias o viremias que han sido relativamente escasas o han pasado inadvertidas, podrían cambiar dramáticamente en el país y convertirse en enfermedades emergentes y reemergentes, que requieren atención inmediata. El panorama se hace más complejo por la participación de aves y pequeños roedores como reservorios de estos virus y que de acuerdo a los hábitos hematofágicos mixtos (zoofílicos, humanos) hacen posible el paso y salto de especies (García, 1996).

2. Objetivos

Los dos grupos de mosquitos seleccionados además de tener en común algunos aspectos de su ecología como los sitios de cría de sus formas inmaduras, su relación con ecosistemas naturales o poco urbanizados y la capacidad de transmitir arbovirus a humanos, tienen en común otros aspectos relacionados con la necesidad de estudiar su taxonomía, morfología con poca variabilidad o desconocida para algunas especies, desconocimiento del número de especies y distribución actualizada con grandes vacíos en Colombia.

Los objetivos de esta investigación fueron:

2.1. Objetivo General

Revisar e identificar, con base en caracteres morfológicos y moleculares, las especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) de importancia médica pertenecientes a dos grupos taxonómicos: género *Trichoprosopon* y subgénero *Anopheles* (*Kerteszia*), actualizando la taxonomía y distribución de los mismos.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar las listas de especies de los grupos de interés para el país y actualizar los datos sobre su distribución.
- Evaluar la presencia y uso de criaderos de los grupos de interés en áreas rurales y de poca urbanización, pero con influencia de procesos de antropización (ecoturismo, expansión de la frontera agrícola).
- Evaluar la presencia de nuevas especies y registrarlas con series tipo.
- Registrar y definir complejos de especies, incluyendo especies simpátricas morfológicamente similares.
- Registrar y definir complejos de especies, incluyendo especies simpátricas morfológicamente similares.

3. Metodología

La propuesta de investigación en el subgénero *Kerteszia* de *Anopheles* involucró dos componentes principales: una fase de campo para georreferenciar y registrar datos de distribución,

biología y tipos de criaderos naturales de *Kerteszia* y una fase de identificación de las especies a partir del análisis de caracteres morfológicos y moleculares.

Para ello se realizaron trabajos de campo, donde se hicieron muestreos de mosquitos inmaduros y adultos, en diferentes localidades de Colombia (Figuras 1 y 2). Las localidades seleccionadas incluyeron ecosistemas costeros (manglar y bosque inundable costero) de la región caribe y pacífico, valles interandinos y bosques altoandinos (Tabla 1). Adicionalmente se visitaron las localidades tipo de algunas especies de *An. (Kerteszia)* en Panamá y se contó con material entomológico de Guatemala. También se hizo una revisión de los registros previos de distribución del subgénero publicados, los cuales sirvieron como referencia para evaluar los posibles patrones predictivos de distribución de los *Kerteszia*.

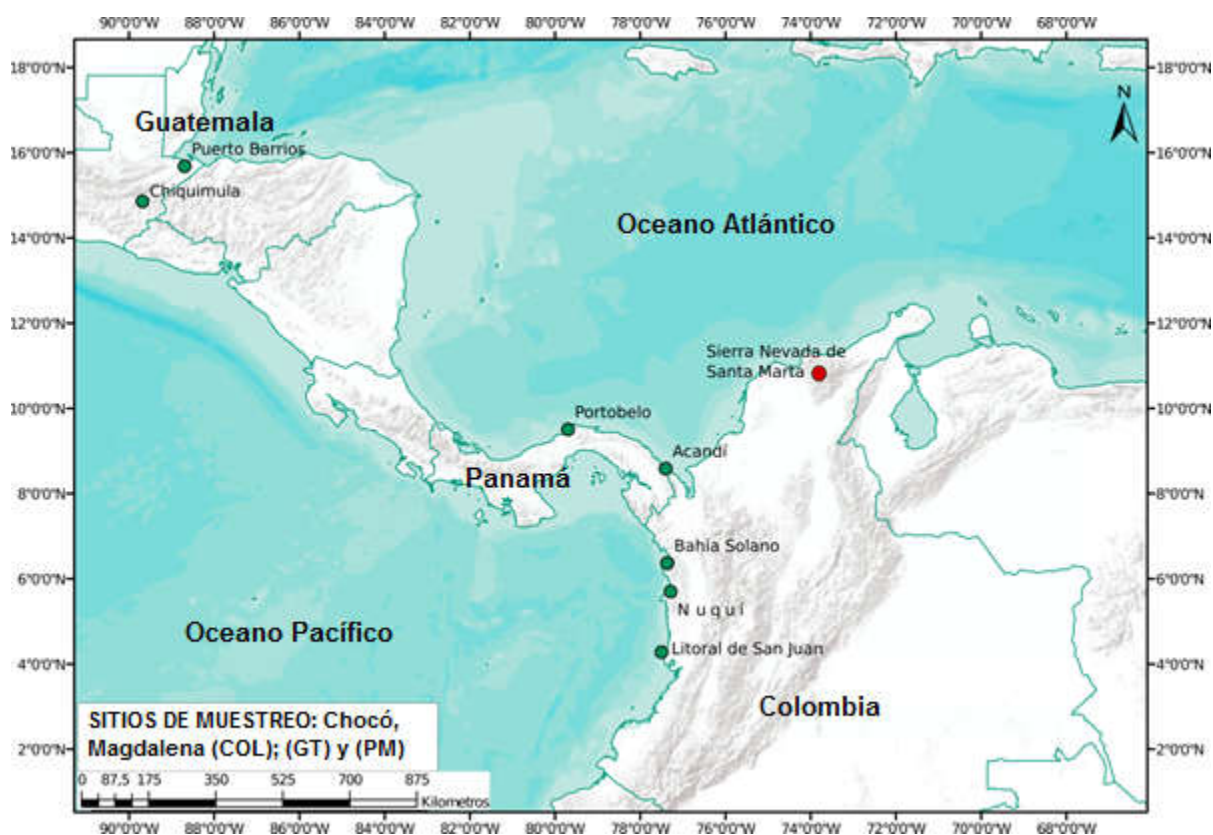


Figura 1. Mapa con sitios de muestreo en Colombia, Panamá [ecosistemas costeros y manglares (verde); costa caribe, bosque húmedo premontano y montano (rojo)] y Guatemala [bosque premontano (verde)]

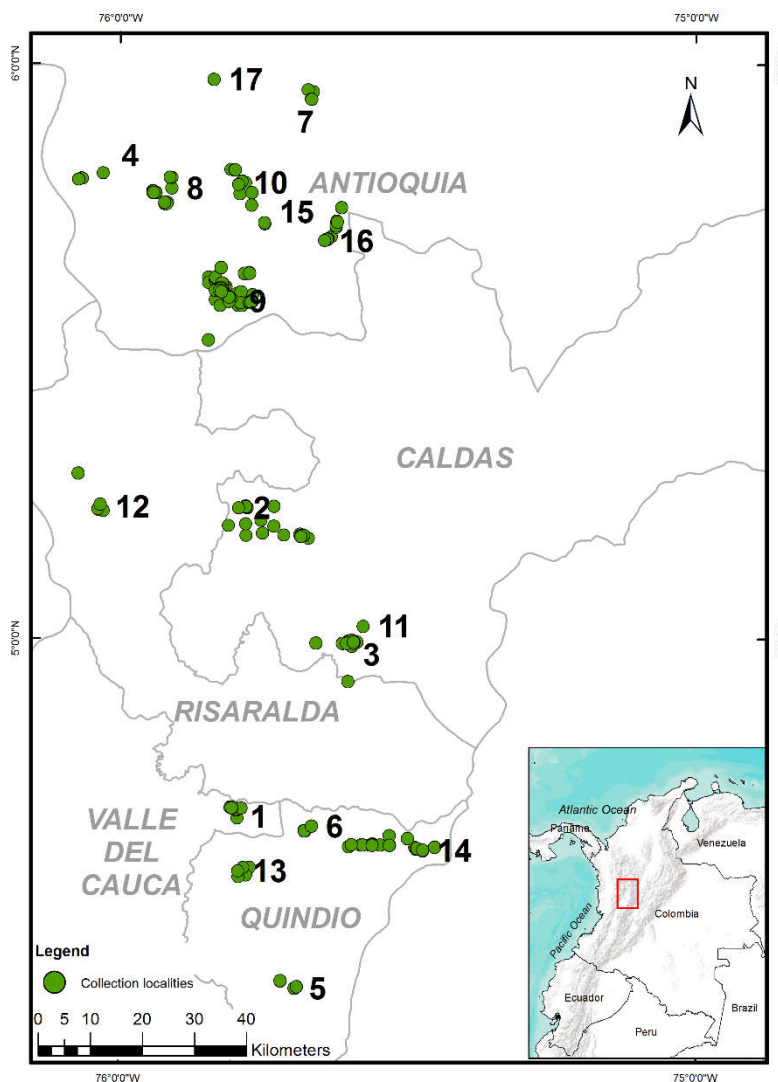


Figura 2. Mapa con sitios de muestreo en Colombia [ecosistemas altoandinos y valles interandinos (verde)]: Alcalá (1), Anserma (2), Chinchiná (3), Ciudad Bolívar (4), Córdoba (5), Filandia (6), Fredonia (7), Hispania (8), Jardín (9), Jericó (10), Manizales (11), Pueblo Rico (12), Quimbaya (13), Salento (14), Támesis (15), Valparaíso (16), Venecia (17)

Inicialmente se identificaron las especies a partir de caracteres morfológicos obtenidos de las series (larva, pupa y adulto) y los patrones de distribución espacial registrados en campo. Herramientas moleculares se usaron para dilucidar y confirmar la diferenciación de las especies, especialmente aquellas que presentan poca variabilidad morfológica y que se encuentran formando grupos hermanos o complejos de especies.

En el caso de *Trichoprosopon*, se realizó una revisión de la tribu a partir de la literatura disponible para el taxa y adicionalmente, se realizó un muestreo entomológico intensivo en campo con énfasis en zonas representativas de los ecosistemas mencionados para el subgénero de

Anopheles. La diferenciación e identificación de las especies y registro de posibles nuevas especies se hizo a partir de caracteres morfológicos obtenidos de series que comprendieron estados de larva, pupa y adulto, además de los patrones de distribución espacial registrados en las colecciones de campo. Las herramientas moleculares se usaron para dilucidar y confirmar la diferenciación de las especies, especialmente aquellas que presentan poca variabilidad morfológica y que se encuentran formando grupos hermanos o complejos de especies.

Tabla 1. Sitios de muestreo de mosquitos del género *Trichoprosopon* y del subgénero *An.* (*Kerteszia*)

País	Departamento ó Provincia*	Municipio ó Distrito*	Coordenadas geográficas	Elevación (m)	
Colombia	Antioquia	Angostura	6°53'N, 75°20'O	1737	
		Belmira	6°08'N, 75°40'O	2860	
		Carepa	7°46'N, 76°40'O	50	
		Ciudad Bolívar	5°47'N, 76°04'O	1900	
		Envigado	6° 09'N, 75°35'O	1670	
		Fredonia	5°57'N, 75°39'O	1600	
		Hispania	5°35'N, 75°46'O	2200	
			5°46'N, 75°56'O	1400	
		Itagüí	6°10'N, 75°37'O	1500	
		Jardín	5°35'N, 75°48'O	1940	
			5°38'N, 75°46'O	2300	
			5°37'N, 75°50'O	1920	
			5°36'N, 75°49'O	1845	
			Jericó	5°47'N, 75°47'O	2000
			La Estrella	6°07'N, 75°40'O	2800
			La Pintada	5°44'N, 75°36'O	600
				5°41'N, 75°38'O	1000
			Maceo	6°32'N, 74°38'O	450
			Medellín	6°15'N, 75°44'O	1450
		Puerto Berrío	6°33'N, 74°34'O	500	
		Sabaneta	6°08'N, 75°36'O	1620	
		Santa Fé de Antioquia	5°43'N, 75°44'O	2100	
			5°46'N, 75°47'O	1850	
		Urrao	6°13'N, 76°08'O	1900	
		Valparaíso	5°41'N, 75°38'O	980	
		Yarumal	6°58'N, 75°24'O	2750	
Caldas	Aguadas	5°44'N, 75°35'O	600		
	Anserma	5°13'N, 75°46'O	1600		

			5°10'N, 75°40'O	850
		Chinchiná	4°59'N, 75°35'O	1400
		Manizales	5°05'N, 75°32'O	1900
			8°36'N, 77°20'O	300
		Acandí	8°34'N, 77°23'O	200
			8°37'N, 77°19'O	10
	Chocó	Bahía Solano	6°20'N, 77°22'O	20
			6°21'N, 77°21'O	90
		Litoral de San Juan	4°16'N, 77°29'O	5
			4°15'N, 77°21'O	10
		Nuquí	5°41'N, 77°16'O	25
Colombia	Magdalena	Santa Marta	11°16'N, 73°59'O	150
			11°16'N, 73°51'O	25
		Córdoba	4°23'N, 75°41'O	1500
			4°24'N, 75°42'O	1200
	Quindío	Filandia	4°40'N, 75°39'O	1900
		Quimbaya	4°35'N, 75°51'O	1100
		Salento	4°38'N, 75°33'O	1900
			4°39'N, 75°28'O	2400
	Risaralda	Pueblo Rico	5°13'N, 76°01'O	1450
	Valle del Cauca	Alcalá	4°42'N, 75°47'O	1200
	Chiquimula	Chiquimula	14°50'N, 89°40'O	1700
Guatemala	Izabal	Puerto Barrios	14°40'N, 88°41'O	900
		Chiriquí Grande	8°41'N, 82°12'O	1150
Panamá	Chiriquí	Boquete	8°47'N, 82°24'O	1400

(*) División política que aplica para Panamá

3.1. Muestreo de mosquitos

Los muestreos de los grupos de mosquitos de interés se realizaron mediante los protocolos modificados para inventarios rápidos de diversidad (RAPIDS) para evaluaciones rápidas de biodiversidad (Ward & Larivière, 2004; Obrist & Duelli, 2010) e inventarios de mosquitos con fines de estudios taxonómicos y de distribución (Belkin *et al.*, 1967). La implementación de estas metodologías está basada en la experiencia de los grupos de investigación que apoyaron la investigación y que ha sido adquirida en diversos proyectos de entomología médica, en los cuales se ha optimizado la estandarización de los métodos de colecta en aspectos como el diseño y tipo de trampas, así como la selección de los sitios de muestreo en las ecorregiones, el esfuerzo de muestreo y la capacidad de búsqueda de sitios de cría de los estados inmaduros en las áreas de interés.

3.2. Colección y montaje del material biológico procedente de campo

Las colecciones y crías de mosquitos se realizaron usando equipos y formularios uniformizados para la obtención de material homogéneo y representativo de cada ecorregión. Para el caso de material biológico con fines taxonómicos, se realizó énfasis sobre crías individuales y de progenies basados en la metodología de Belkin *et al.* (1967). También se realizaron colecciones con montajes de adultos y de fases inmaduras. Se georreferenciaron todos los sitios de colecta y se registraron aspectos del hábitat como: tipo y características del criadero, tipo de cobertura vegetal, elevación (msnm), método de colecta, entre otros aspectos. Todo el material se procesó e identificó en el Grupo de Sistemática Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (GSMUN) y el CDC (Atlanta, USA) utilizando la metodología propuesta para mosquitos por Pecor & Gaffigan (1997) y bajo la asesoría y recomendaciones del Dr. Charles Porter. Las listas de especies elaboradas incluyen los datos de actualización sobre presencia y distribución de las especies.

3.3. Identificación taxonómica y variabilidad molecular

La identificación taxonómica se realizó con base en caracteres morfológicos y moleculares. Para el primer caso, se usaron las claves taxonómicas para mosquitos neotropicales publicadas por Clark-Gil & Darsie Jr., 1983; Forattini, 2002; González & Carrejo, 2009; Lane & Cerqueira, 1942; Lane, 1953 & Zavortink, 1973, 1979. Además de las revisiones, descripciones y anotaciones taxonómicas para estos grupos de mosquitos como las de Belkin, 1952, Belkin *et al.*, 1971; Cerqueira, 1961; Dyar & Knab, 1906; Levi, 1953; Stone, 1944; Xavier & Mattos, 1967 y Zavortink, 1973, 1979, 1981). También se realizó un estudio detallado sobre la morfología de adultos e inmaduros (larvas de IV instar, exuvias de larvas y de pupas). Se enfatizó en aquellas especies que presentan características morfológicas diferentes a las descritas en las diagnósticos de las especies tipo publicadas en la literatura. En los casos en que fue posible, se compararon las características morfológicas con las de algunos dibujos y fotos de las especies tipo, además de contar con la asesoría del especialista en el grupo. Lo anterior permitió hacer una selección de aquellas especies potencialmente nuevas y objeto de estudios descriptivos morfológicos.

Para el caso de la taxonomía a partir de caracteres moleculares, como alternativa para complementar la identificación realizada con base en caracteres morfológicos, se trabajó en la obtención de la secuencia de ADN propuesta a nivel mundial como un código genético de barras con base en una secuencia corta (600 pb) del gen mitocondrial *cox1* (Folmer *et al.*, 1994; Hebert & Gregory, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2007). Además, se amplificó y secuenció una región que corresponden al extremo 3' del gen CytB, el ARNtSER completo y el extremo 5' del gen ND1 con una longitud de 489 bp para verificar congruencia y especificidad en la delimitación de especies. El propósito de esta metodología fue validar una herramienta molecular para la asignación de especímenes a una unidad taxonómica previamente identificada por métodos

moleculares y verificada desde la morfología por un especialista y a la cual también se le han asignado los haplotipos de las regiones moleculares. Los haplotipos se usan como complemento de la identidad con base en morfología y el estatus de las especies se valida mediante comparación con secuencias de éstas y otras especies que se encuentran reportadas en bases de datos como GenBank y CBOL (Consortium for the Barcode of Life). Se busca evaluar si las secuencias obtenidas tienen funcionalidad como caracteres moleculares para estudios de diversidad, taxonomía y sistemática en los grupos de mosquitos bajo estudio. Esta parte se realizó a partir de los protocolos adaptados para tal fin como el de extracción de ADN a partir de patas de mosquitos (Collins y Porter 1990 modificado Uribe *et al.*, 1998) y bajo la asesoría de investigadores partícipes de la propuesta MBI (Mosquito Barcoding Initiative) (IBOL- Initiative Barcode of Life).

Referencias

Ahumada, M. L., Pareja, P. X., Buitrago, L. S., & Quiñones, M. L. (2013). Comportamiento de picadura de *Anopheles darlingi* Root, 1926 (Diptera: Culicidae) y su asociación con la transmisión de malaria en Villavicencio (Colombia). *Biomédica*, 33(2).

Ahumada, M. L., Orjuela, L. I., Pareja, P. X., Conde, M., Cabarcas, D. M., Cubillos, E. F., & Quiñones, M. L. (2016). Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria journal*, 15(1), 407.

Aitken, T.H.G., J.O. Hingwan, R. Manuel, and H. Hosein. (1968a). Laboratory colonization of *Trichoprosopon digitatum* (Rondani) (Diptera: Culicidae). *Mosq. News* 28:445-454.

Aitken, T.H.G., L. Spence, A.H. Jonkers, and C.R. Anderson. (1968b). *Wyeomyia*- virus isolations in Trinidad, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 17:886-888.

Alimi, T. O., Fuller, D. O., Qualls, W. A., Herrera, S. V., Arevalo-Herrera, M., Quinones, M. L., Beier, J. C. (2015). Predicting potential ranges of primary malaria vectors and malaria in northern South America based on projected changes in climate, land cover and human population. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–16.

Altamiranda, M., Arboleda, S., Parra, J. L., Peterson, A. T., & Correa, M. M. (2017). Potential distribution of mosquito vector species in a primary malaria endemic region of Colombia. *PLoS ONE*, 12(6), 1–14.

Barajas G., J., Suaza V., J. D., Torres G., C., León Rúa, G., Uribe-Soto, S., & Porter, C. H. (2013). Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 132–140.

Bargielowski, I. E., Lounibos, L. P., Shin, D., Smartt, C. T., Carrasquilla, M. C., Henry, A.,... Dennett, J. A. (2015). Widespread evidence for interspecific mating between *Aedes aegypti*

and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in nature. *Infection, Genetics and Evolution*, 36(September), 456–461.

Beaty BJ, Marquardt WC, eds. (1996). *The Biology of Disease Vectors*. Ni-wot, CO: University Press of Colorado, 146–159.

Belkin, J.N. (1952). The homology of the chaetotaxy of immature mosquitoes and revised nomenclature for the chaetotaxy of pupa (Diptera, Culicidae). *Proc.Ent. Soc. Wash.* 54(3): 115-130.

Belkin, N; Schick, R.X; Galindo, P; Aitken, T; Barreto, P, (trad.); Martín, F.J, (trad.); Adames, A.J, (trad.). (1967). *Estudios sobre mosquitos (Diptera, Culicidae). Un proyecto para un estudio sistemático de los mosquitos de Mesoamérica.* v. 1, 2: p. 1-19.

Biassi, D. L., Marcondes, C. B., Wagner, G., & Muller, G. A. (2015). Mosquito species collected in a fragmented of the Atlantic forest bioma in the southern of Brazil. *Int. J. Fauna Biol. Stud*, 2, 35-37.

Cáceres, L., Rovira, J., García, A., & Torres, R. (2011). Determination of the resistance to organophosphate, carbamate, and pyrethroid insecticides in Panamanian *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Biomédica*, 31(3), 419–427.

Carvajal, H.; de Herrera, M.; Quintero, J.; Alzate, A. & Herrera, S. (1989). *Anopheles neivai*: a Vector of Malaria in the Pacific Lowlands of Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83 (5): 609.

Castañeda, C., Díaz, H., Alvis-Guzman, N., Olarte, A., Rodriguez, H., Camargo, G., & De la Hoz-Restrepo, F. (2012). Burden of Disease and Economic Impact of Dengue and Severe Dengue in Colombia, 2011. *Value in Health Regional Issues*, 1(2), 123–128.

Castro, M. C. (2017). *Malaria Transmission and Prospects for Malaria Eradication: The Role of the Environment.* *Biology in the Era of Eradication*, 1.

Causey, O.R., C.E. Causey, O.M. Maroja, and D.G. Macedo. 1961. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon Region of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10:227-249.

Ceretti, W., de Oliveira Christe, R., Rizzo, M., Strobel, R. C., de Matos Junior, M. O., de Mello, M. H. S. H., ... & Marrelli, M. T. (2016). Species composition and ecological aspects of immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in bromeliads in urban parks in the city of Sao Paulo, Brazil. *Journal of arthropod-borne diseases*, 10(1), 102.

Clark, S., & Darsie, R. F. (1983). The mosquitoes of Guatemala, their identification, distribution and bionomics, with keys to adult females and larvae. *Mosquito Systematics*, 15(3), 151-284.

Cywinska, A.; Hunter, F.F. and Hebert, P.D.N. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*. 20: 413-424.

Daniel, C. J., Frid, L., Sleeter, B. M., & Fortin, M. J. (2016). State-and-transition simulation models: a framework for forecasting landscape change. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1413–1423.

De Rodaniche, E., Galindo, P., & Johnson, C. M. (1957). Isolation of yellow fever virus from *Haemagogus lucifer*, *H. equinus*, *H. spegazzinii falco*, *Sabethes chloropterus* and *Anopheles neivai* captured in Panama in the fall of 1956. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 6(4), 681-685.

Di Giallonardo, F., Geoghegan, J. L., Docherty, D. E., McLean, R. G., Zody, M. C., Qu, J., Holmes, C. (2016). Fluid Spatial Dynamics of West Nile Virus in the United States : Rapid. *Journal of Virology*, 90(2), 862–872.

Dick, O. B., San Martín, J. L., Montoya, R. H., Del Diego, J., Zambrano, B., & Dayan, G. H. (2012). Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(4), 584–593.

Dusfour, I., Thalmensy, V., Gaborit, P., Issaly, J., Carinci, R., & Girod, R. (2011). Multiple insecticide resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations compromises the effectiveness of dengue vector control in French Guiana. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(3), 346–352.

Dyar, H. G. & F. Knab. 1906. Diagnoses of newspecies of mosquitoes. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 19:133-142.

Ferreira, M. (2012). Ecología de Culicideos (Díptera: Culicidae) da Área de Proteção Ambiental do Rio Curiaú, Macapá, Amapá. Macapá: Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical.

Finlay. (1881). “The mosquito hypothetically considered as an agent of yellow fever transmission. 1881,”. *Salud Pública de México*, vol.34, no.4, pp.474–483,1992.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294–299.

Forattini, O. P. 1965. *Entomología Médica*. Universidade de Sao Paulo. Vol. 3, 413 pp.

Forattini, O. P., Kakitani, I., Massad, E., & Gomes, A. C. (1993). Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 1--Parity of blood seeking *Anopheles (Kerteszia)* in south-eastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 27(1), 1–8.

Forattini OP. (2002). *Culicidologia Médica*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Vol. 2, p. 139-152.

Forget, G., & Lebel, J. (2001). An ecosystem approach to human health. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 7(2 SUPPL.).

Fuller, D. O., Alimi, T., Herrera, S., Beier, J. C., & Quiñones, M. L. (2016). Spatial association between malaria vector species richness and malaria in Colombia. *Acta Tropica*, 158, 197–200.

Galindo, P., P.H. Peralta, R.B. Mackenzie, and H.K. Beye. (1964). St. Louis encephalitis in Panama: a review and a progress report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13:455.

Galindo, P., S. Srihongse, E. de Rodaniche, and M.A. Grayson. (1966). An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959-1962. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15:385-400.

García, J. E. (1996). Mosquitos domiciliarios (Diptera: Culicidae) y su relación como vectores de arbovirus en la ciudad de Mérida, Yucatán, México (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Grogan, L. F., Berger, L., Rose, K., Grillo, V., Cashins, S. D., & Skerratt, L. F. (2014). Surveillance for Emerging Biodiversity Diseases of Wildlife. *PLoS Pathogens*, 10(5), 3–6.

Gómez, A., Suaza, J., Castaño, S., Triana, O., & Uribe, S. (2017). Infección de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) con el genotipo asiático-americano del virus del dengue serotipo 2 en Medellín y su posible papel como vector del dengue en Colombia. *Biomédica*, 37, 135-142.

González R, Carrejo NS. (2009). Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. 2nded. Cali: Universidad del Valle. 260 p.

Gubler, D. J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology*, 10(2), 100-103.

Guhl, A. (2004). Coffee and landscape change in the colombian countryside 1970-2002 (Doctoral dissertation, University of Florida).

Gutiérrez, L.A., Naranjo, N., Jaramillo, L.M., Muskus, C., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2008). Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*, 107, 99–105.

Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. & Hebert, P.D.N. (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 968–971.

Harbach, R.E. (2013). Culicidae. Mosquito Taxonomic Inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045> sitio web visitado el 7 de febrero, 2019.

Hastriter M, Lawyer P. (1998). Disease vector ecology profile Colombia. Washington (DC): Armed Forces Pest Management Board; 80 pp.

Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.

Hoyos, R., Soto, S. U., Rúa-Uribe, G., & Gallego-Gómez, J. C. (2015a). Molecular identification of Saint Louis encephalitis virus genotype IV in Colombia. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(6), 719–725.

Hoyos L, R., Suaza V, J., Tenorio, A., Uribe, S., & Gallego-Gomez, J. (2015b). Detección molecular del virus de Encefalitis Equina del Este en mosquitos de La Pintada, Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*, 20(3), 4800–4806.

Kumar, N.P., Rajavel, A.R., Natarajan, R. & Jambulingam, P. (2007). DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44 (1), 1–7.

Lane, J., & Cerqueira, N. L. (1942). The Sabethines of America. *Archivos de Zoologia do Estado de São Paulo*, 3(Art. IX), 473-849.

Lausch, A., Blaschke, T., Haase, D., Herzog, F., Syrbe, R. U., Tischendorf, L., & Walz, U. (2015). Understanding and quantifying landscape structure - A review on relevant process characteristics, data models and landscape metrics. *Ecological Modelling*, 295, 31–41.

Lee, V. H., & Sanmartin, C. (1967). Isolations of Guaroa virus from *Anopheles (Kerteszia) neivai* in the Pacific lowlands of Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 16(6), 778-781.

Levi, R. (1953). Lista provisional y distribución de los mosquitos Culicinos del Ecuador. *Revista Ecuatoriana Entomologia Parasitologia*, 1, 34-45.

Linton, Y. M. 2005. Mosquito barcoding initiative. Draft Minutes of MBI inceptive meeting, London. Nov. 2005: 1-14.

Long, K. C., Ziegler, S. A., Thangamani, S., Hausser, N. L., Kochel, T. J., Higgs, S., & Tesh, R. B. (2011). Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(4), 750–757.

López-Rubio, A., Suaza-Vasco, J. D., Solari, S., Gutiérrez-Builes, L., Porter, C., & Uribe, S. I. (2019). Intraspecific phylogeny of *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab 1913, based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Infection, Genetics and Evolution*, 67(November 2018), 183–190.

López-Rubio, A., Suaza-Vasco, J., Marcet, P. L., Ruíz-Molina, N., Cáceres, L., Porter, C., & Uribe, S. (2016). Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia. *Zootaxa*, 4175(4), 377–389.

Manson, P. (1879). On the development of *Filaria sanguis hominis* and on the mosquito considered as a nurse. *J Linn Soc (Zool)*, 14:304-311.

Martinez, D., Murray, K. O., Reyna, M., Arafat, R. R., Gorena, R., Shah, U. A., & Debboun, M. (2017). West Nile virus outbreak in Houston and Harris county, Texas, USA, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 23(8), 1372–1376.

Masuoka, P., Klein, T. A., Kim, H. C., Claborn, D. M., Achee, N., Andre, R. ... Grieco, J. (2010). Modeling the distribution of *Culex tritaeniorhynchus* to predict Japanese Encephalitis distribution in the Republic of Korea. *Geospatial Health*, 5(1), 45–57.

Mathews, F. (2009). Chapter 8 Zoonoses in Wildlife. Integrating Ecology into Management. *Advances in Parasitology* (1st ed., Vol. 68). Elsevier Ltd.

Mavale, M., Sudeep, A., Gokhale, M., Hundekar, S., Parashar, D., Ghodke, Y. ... Mishra, A. C. (2012). Short report: Persistence of viral RNA in chikungunya virus-infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) mosquitoes after prolonged storage at 28°C. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(1), 178–180.

Méndez, F., Barreto, M., Arias, J. F., Rengifo, G., & Muñoz, J. (2006). Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue – endemic region of Colombia Poor method for finding association. *Tropical Medicine*, 74(36), 678–683.

Min, X. J. and Hickey, D. A. 2007. DNA barcodes provide a quick preview of mitochondrial genome composition. *Plos One*. 2 (3): e325. doi: 10.1371/journal.pone.0000325

Moffett, A., Shackelford, N., & Sarkar, S. (2007). Malaria in Africa: Vector species' niche models and relative risk maps. *PLoS ONE*, 2(9).

Montoya, J., Solarte, Y. A., Giraldo-Calderón, G. I., Quiñones, M. L., Ruiz-López, F., Wilkerson, R. C., & González, R. (2011). Malaria vector species in Colombia: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 223-238.

Moon, S. A., Cohnstaedt, L. W., Mcvey, D. S., & Scoglio, C. M. (2018). A spatio-temporal individual-based network framework for West Nile virus in the USA : spreading pattern of West Nile virus Author summary, 1–25.

Moreira., Rodrigues de Sá, I. L., Bergamaschi, D. P., & Sallum, M. A. M. (2016). *Kerteszia* Theobald (Diptera: Culicidae) mosquitoes and bromeliads: A landscape ecology approach regarding two species in the Atlantic rainforest. *Acta Tropica*, 164, 303–313.

Morse, S. S. (1995). Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1(1), 7–15.

Naranjo-Díaz, N., Altamiranda, M., Luckhart, S., Conn, J. E., & Correa, M. M. (2014). Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. *PLoS ONE*, 9(8), 1–9.

Navarro, J. C., Del Ventura, F., Zorrilla, A., & Liria, J. (2010). Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Revista de biología tropical*, 58(1), 245-254.

Obrist, M. K., & Duelli, P. (2010). Rapid biodiversity assessment of arthropods for monitoring average local species richness and related ecosystem services. *Biodiversity and Conservation*, 19(8), 2201–2220.

Paula, M. B. D., Fernandes, A., Medeiros-Sousa, A. R., Ceretti-Júnior, W., Christe, R., Stroebel, R. C., & Jacintho, M. C. D. O. (2015). Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in parks in greater São Paulo, Brazil. *Biota Neotropica*, 15(3).

Pecor, J., & Gaffigan, T. (1997). Laboratory and field protocols. Walter Reed Biosystematics Unit. [Internet document cited January 2019.].

Perfecto, I., Vandermeer, J., Hanson, P., & Cartín, V. (1997). Arthropod biodiversity loss and the transformation of a tropical agro-ecosystem. *Biodiversity and Conservation*, 6(7), 935–945.

Pfenninger, M.; Nowak, C.; Kley, C.; Steinke, D. and Streit, B. 2007. Utility of DNA taxonomy and barcoding for the inference of larval community structure in morphologically cryptic chironomus (Diptera) species. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/j.1365/294X.2006.03136.x.

Quiñones, M. L., Ruiz, F., Calle, D. A., Harbach, R. E., Erazo, H. F., & Linton, Y. M. (2006). Incrimination of *Anopheles (Nyssorhynchus) rangeli* and *An. (Nys.) oswaldoi* as natural vectors of *Plasmodium vivax* in Southern Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(6), 617-623.

Roca, M. (1944). The isolation of three neurotropic viruses from forest mosquitoes in eastern Colombia. *The Journal of Infectious Diseases*, 160-169.

Rodríguez-Morales, A. J., Orrego-Acevedo, C. A., Zambrano-Muñoz, Y., García-Folleco, F. J., Herrera-Giraldo, A. C., & Lozada-Riascos, C. O. (2015). Mapping malaria in municipalities of the Coffee Triangle region of Colombia using Geographic Information Systems (GIS). *Journal of Infection and Public Health*, 8(6), 603–611.

Rodríguez, M. M., Bisset, J. A., & Fernández, D. (2007). Levels of Insecticide Resistance and Resistance Mechanisms in *Aedes Aegypti* From Some Latin American Countries. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23(4), 420–429.

Rona, L.; Carvalho-Pinto, C.; Gentile, C.; Grisard, E. & Peixoto, A. (2009). Assessing the Molecular Divergence Between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Populations from Brazil Using the Timeless Gene: Further Evidence of a Species Complex. *Malaria Journal* 8: 60.

Rúa, G. L., Suárez-Acosta, C. del R., & Rojo, R. A. (2012). Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia TT - Epidemiological implications of *Aedes albopictus* (Skuse) in Colombia. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 30(3), 328–337.

Rubio Y, Zimmerman R. (1997). Ecoregional Classification of Malaria Vectors in the Neotropics, *Journal of Medical Entomology*, Volume 34, 5: 499–510.

Ruíz, F., Wilkerson, R. C., Conn, J. E., McKeon, S. N., Levin, D. M., Quiñones, M. L., & Linton, Y. M. (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & vectors*, 5(1), 44.

Sachs, J., & Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature*, 415(6872), 680.

Sallam, M. F., Xue, R. De, Pereira, R. M., & Koehler, P. G. (2016). Ecological niche modeling of mosquito vectors of West Nile virus in St. John's County, Florida, USA. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–14.

Sinka ME, Rubio Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, Van Boeckel T, Kabaria CW, Harbach RE, Hay SI. (2010). The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*. 3(4):72.

Stojanovich, C.; Gorham, J. & Scott, H. (1966). *Clave Ilustrada para Los Anofelinos de América Central y Panamá*. Atlanta: United States Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Communicable Disease Center. 44 p.

Stone, A. (1944). Notes on the genus *Trichoprosopon* (Diptera, Culicidae). *Apuntes sobre el género Trichoprosopon* (Diptera, Culicidae). *Revista de Entomologia* (Rio de Janeiro), 15(3), 335-341.

Torres, J. R., & Castro, J. (2007). The health and economic impact of dengue in Latin America. *Cadernos de Saúde Pública / Ministério Da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*, 23 Suppl 1, S23-31.

Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K. A., Holmes, E. C., & Weaver, S. C. (2011). Fever from the forest: Prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature Reviews Microbiology*, 9(7), 532–541.

Venegas, E. A., Aguilar, P. V., Cruz, C., Guevara, C., Kochel, T. J., Vargas, J., & Halsey, E. S. (2012). Ilheus virus infection in human, Bolivia. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3), 516–518.

Ward, D. F., & Larivière, M. (2018). New Zealand Ecological Society Terrestrial invertebrate surveys and rapid biodiversity assessment in New Zealand : lessons from Australia Author (s): Darren F . Ward and Marie-Claude Larivière Source : *New Zealand Journal of Ecology* , Vol . 28 , No . 1 , 28(1), 151–159.

Weissenbacher, M, Salvatella R, Hortal, M. (1998). El desafío de las enfermedades emergentes y reemergentes. *Rev MedUrug*, 14: 34-48.

Welburn, S. C., Beange, I., Ducrotoy, M. J., & Okello, A. L. (2015). The neglected zoonoses-the case for integrated control and advocacy. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(5), 433–443.

Xavier, S.H.; Mattos, S.S. 1976. Geographical distribution of Culicinae in Brazil - IV. State of Amazonas (Diptera, Culicidae). *Mosquito Systematics*, 8(4): 386-412.

Zavortink, T. (1973). Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Estudios sobre zancudos* (Diptera, Culicidae). XXIX. V. 9, 3: 1-54.

Zavortink, T. (1979). Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXV. The new sabethini genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. Estudios sobre zancudos (Díptera, Culicidae). XXXV. V. 17, 1: 1-61.

Zavortink, T. J. (1981). Species complexes in the genus *Trichoprosopon*. Mosquito Systematics, 13(1), 82-85.

Capítulo 2

Género *Trichoprosopon*

1. The Sabethines of Northern Andean Coffee-Growing Regions of Colombia

[Artículo publicado en Journal of the American Mosquito Control Association, 31(2): 125-135, (2015)]

2. Taxonomía, bionomía, distribución geográfica e importancia médica del género *Trichoprosopon* Theobald, 1901 (Diptera: Culicidae) en Colombia y otras regiones de Centro y Suramérica

[Artículo publicado en el Boletín del Museo Entomológico Francisco Luis Gallego, 8(4): 29-49, (2016)]

Taxonomía, Bionomía, Distribución Geográfica e Importancia Médica del Género *Trichoprosopon* Theobald, 1901 (Diptera: Culicidae) en Colombia y Otras Regiones de Centro y Suramérica.

Juan David Suaza Vasco

Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Trabajo realizado en el marco de la tesis de doctorado en el programa de Ciencias Básicas Biomédicas (Universidad de Antioquia)

RESUMEN

Los mosquitos del género *Trichoprosopon* se encuentran ubicados taxonómicamente en la tribu Sabethini Blanchard, 1905 de la subfamilia Culicinae. La monofilia de la tribu ha sido confirmada por los análisis cladísticos de Judd (1996), Harbach & Kitching, (1998) y Harbach & Peyton (2000). Harbach (2007), en un estudio de filogenia basado en la reclasificación de Culicidae, encontró que el género *Trichoprosopon* del Nuevo Mundo es pareado con el género *Tripteroides* del Viejo Mundo y es grupo hermano del género *Kimia* (Harbach, *et al.* 2007) localizado al este de la región Oriental. En cuanto a la distribución de *Trichoprosopon*, sus especies se localizan desde el Centro de México hasta el sur del lado pacífico del Ecuador y en el lado Atlántico del sur de Argentina. Los mosquitos de este género son básicamente habitantes de bosques. Sus estados inmaduros se encuentran asociados a cuerpos de agua formados en estructuras vegetales conocidos como fitotelmata. Las hojas de las bromelias, bracteos florales de calateas y heliconias, hojas de palmas caídas, entrenudos de guadua perforados, tocones y guadas caídas, cáscaras de coco y cacao y agujeros en los árboles son algunos de los fitotelmata donde se han encontrado las especies del género. Algunas veces es posible encontrar estados inmaduros en recipientes artificiales. Las hembras adultas de algunas de las especies de *Trichoprosopon* pican a humanos en áreas sombreadas durante el día. Con respecto a la importancia médica, *Tr. digitatum* es la especie reconocida como vector de virus en humanos. Algunos de los virus aislados son Wyeomyia y Pixuna. También se han aislado otros virus como Bussuquara, Ilheus y Encefalitis de San Luis a partir de “pools” que incluyen especies del género *Trichoprosopon*.

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoprosopon* hace parte de la subfamilia Sabethini, la cual posee 423 especies reconocidas ubicadas en 14 géneros (Harbach, 2007). Las especies de Sabethini se encuentran distribuidas en su mayoría en las regiones Neotropical, Oriental y Australasia (Figura 1). Otras pocas especies se localizan en las regiones templadas. Nueve de los géneros de Sabethini se encuentran restringidos a la región Neotropical:

Isostomyia, *Johnbelkinia*, *Limatus*, *Onirion*, *Sabethes*, *Shannoniana*, *Runchomyia*, *Wyeomyia* y *Trichoprosopon*. Algunas especies de *Wyeomyia* se encuentran en la parte oriental de Norte América. Para el Viejo Mundo se reconocen únicamente 5 géneros: *Malaya* en África y en la region Oriental y Australasia, *Topomyia* en la Región Oriental y Nueva Guinea, *Maorigoeldia* en Nueva Zelanda, *Kimia* en el este de la región Oriental y *Tripteroides* en la región Oriental, la Australasia y la parte Sur de la región Paleártica (Harbach, 2007) (Tabla 1).

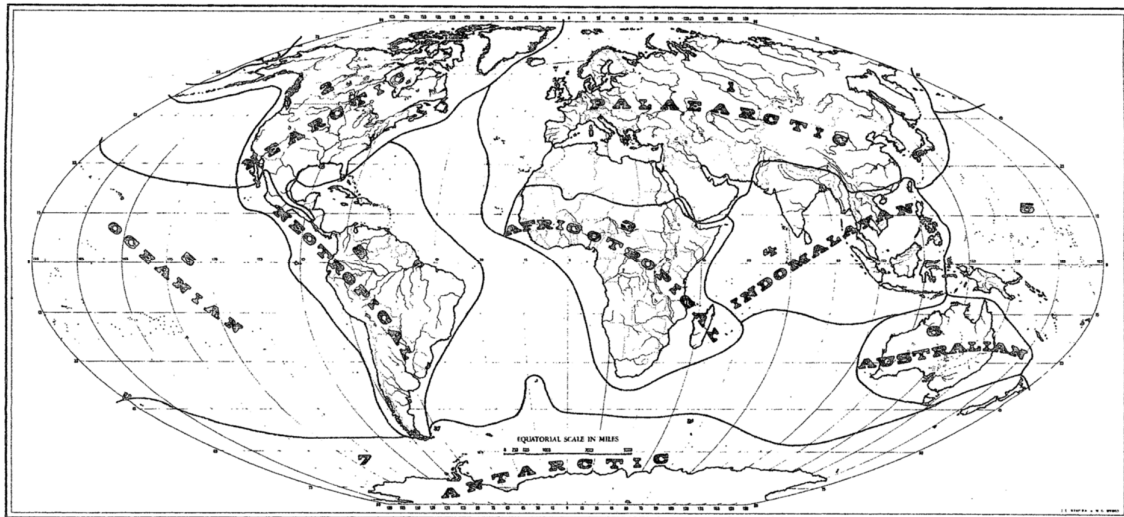


Figura 1. Reinos Terrestres Biogeográficos del Mundo (Udvardi, 1975).

Los análisis cladísticos de la tribu Sabethini realizados por Judd, 1966; Harbach & Kitching, 1998 Harbach & Peyton, 2000, han confirmado la monofilia de la subfamilia Sabethini y han indicado que los géneros del Viejo Mundo tienen un arreglo parafiletico con respecto al arreglo monofilético de los taxa del Nuevo Mundo. Contrario a estos hallazgos, Harbach *et al.* 2007 no recobraron como un clado monofilético a los géneros del Nuevo Mundo de la tribu Sabethini al relacionarlos con los géneros del Viejo Mundo. En este mismo estudio, el género *Trichoprosopon* del Nuevo Mundo fue pareado con el género *Tripteroides* del Viejo Mundo en un grupo hermano con el género *Kimia* de la región Oriental.

Los adultos de Sabethini no son fáciles de caracterizar (Harbach, 2010). Algunas de sus características son que la mayoría de las especies tienen la base de la coxa posterior en línea o ligeramente arriba del mesonero. Dicha estructura es mas pequeña que en los mosquitos no sabetinos (Harbach, 2010). Las setas prespiraculares están siempre

presentes, excepto en una especie de *Malaya*. Mientras que en el género *Limatus* son reemplazadas por escamas (Harbach, 2010). El mesopostnoto generalmente tiene grupos de setas o escamas (Lane & Cerqueira, 1942; Lane, 1953).

En cuanto a su bionomía, las larvas de los Sabethini están en su gran mayoría restringidas al agua contenida en habitats fitotelmata (estructuras vegetales que almacenan agua y materia orgánica) (Lane & Cerqueira, 1942; Frank & Curtis, 1981). Ejemplos de estos habitats son las axilas de hojas de bromelias, recipientes de bambú, agujeros en árboles y bracteas florales requiriendo algunas de las especies de mosquitos plantas específicas (Belkin *et al.* 1969; Cyrino & Lopes 2001). También se han colectado unas pocas especies en conchas de caracol y hoyos en las rocas. Otras son capaces de desarrollarse en contenedores artificiales (AFPMB, 1998). En muchos de los géneros las larvas son depredadoras con mandíbulas o maxilas modificadas para capturar presas. La mayoría de las larvas de los Sabethini se poseionan sobre su dorso en el piso de la cavidad del contenedor y frecuentemente van a la superficie (Harbach, 2010). Los adultos de este género son considerados mosquitos de bosques. Las hembras adultas de la mayoría de sus especies succionan sangre, algunas veces en humanos. Muchas especies son activas durante el día. La mayoría vuelan con las patas posteriores dobladas por encima del dorso como es el caso de los adultos de *Trichoprosopon* (Lane & Cerqueira, 1942).

Con respecto a la importancia médica, algunas de las especies de Sabethini, éstas han sido vinculadas en la región Neotropical como transmisores de virus, específicamente en los géneros *Limatus*, *Sabethes*, *Jhonbelkinia*, *Trichoprosopon* y *Wyeomyia* (Forattinni, 2002). En el Viejo mundo no se ha encontrado especies de Sabethini transmisoras de patógenos a humanos o animales (Harbach, 2010).

	GÉNERO	DISTRIBUCIÓN
TRIBU SABETHINI	<i>Isostomyia</i>	Región Neotropical
	<i>Jhonbelkinia</i>	Región Neotropical
	<i>Kimia</i>	Lado este de la Región Oriental
	<i>Limatus</i>	Región Neotropical
	<i>Malaya</i>	Africa, Región Oriental y Australasia
	<i>Maorigoeldia</i>	Nueva Zelanda

	<i>Onirion</i>	Región Neotropical
	<i>Runchomyia</i>	Región Neotropical
	<i>Sabethes</i>	Región Neotropical
	<i>Shannoniana</i>	Región Neotropical
	<i>Topomyia</i>	Región Oriental y Nueva Guinea
	<i>Trichoprosopon</i>	Región Neotropical
	<i>Tripteroides</i>	Región Oriental, Australasia y sur del Palearctico
	<i>Wyeomyia</i>	Región Neotropical

TABLA 1. Tribu Sabethini: Lista de Géneros y su distribución geográfica (Harbach, 2010).

EL GÉNERO *Trichoprosopon*

1. TAXONOMÍA

El género *Trichoprosopon* comprende las especies de sabetinos del nuevo mundo sin una obvia especialización en la estructura o coloración de los mosquitos adultos (Lane & Cerqueira 1942). Estas especies fueron antes ubicadas en los tres géneros *Joblotia*, *Goeldia* e *Isostomyia* (Dyar, 1928). Posteriormente, Eduards (1932) las reorganizó en los

dos géneros *Trichoprosopon* y *Goeldia*. Zavortink (1979a, 1979b) reclasificó y dividió el género *Trichoprosopon* en cuatro géneros segregados: *Trichoprosopon*, *Shannoniana*, *Runchomyia* y *Johnbelkinia* basándose en caracteres morfológicos. Se reconocen al menos 21 especies del género *Trichoprosopon* las cuales se encuentran en uno de los siguientes cuatro complejos de especies: *Tr. digitatum*, *Tr. lampropus*, *Tr. compressum* y *Tr. pallidiventer*. Según Harbach (2010) en su página web Mosquito Taxonomic Inventory, el género *Trichoprosopon* esta constituido por 13 especies reconocidas, pero hace referencia a que hay otras especies aun no descritas. La siguiente es la lista de especies de *Trichoprosopon* que reporta Harbach en la web (www.mosquito-taxonomic-inventory.info):

Especies Reconocidas:

andinum Levi-Castillo, 1953
brevipes (da Costa Lima, 1931)
castroi Lane & Cerqueira, 1942
compressum Lutz, 1905
 subspecies *compressum* Lutz, 1905
 subspecies *mogilasium* (Dyar & Knab, 1907)
digitatum (Rondani, 1848)
 subspecies *digitatum* (Rondani, 1848)
 subspecies *townsendi* Stone, 1944
evansae Antunes, 1942
lampropus (Howard, Dyar & Knab, 1913)
lanei (Antunes, 1937)
obscurum Lane & Cerqueira, 1942
pallidiventer (Lutz, 1905)
simile Lane & Cerqueira, 1942
soaresi Lane & Cerqueira, 1942
vonplesseni (Dyar & Knab, 1906)

Nomina dubia (Nombres dudosos)

cotopaxense Levi-Castillo, 1953
hyperleucum (Martini, 1931)

En cuanto a los caracteres morfológicos del género *Trichoprosopon* más representativos para efectos de su taxonomía se encuentran los siguientes: Los adultos presentan una proboscis corta, presenta una hilera de setas largas en la parte basal de la esternopleura y en la tibia posterior hay ausencia de la banda clara postmediana, presente en el género *Sabethes*. En la larva, el foramen magnum es circular y presenta un distintivo collar, la mandíbula es alargada y la maxila tiene unos palpos largos notorios; La seta 8-M es ausente, posee muchas setas abdominales creciendo a partir de tuberculos esclerotizados; el sifón es coto y con una seta I larga y ramificada; el pecten es ausente. En la pupa, los segmentos III-V no poseen sensilios dorsales y en los segmentos III-VI la seta V es muy pequeña. La genitalia de los machos son simples, los lóbulo IX-T son largos y con numerosas setas gruesas, el paraprocter es bien desarrollado y presenta un diente apical; el edeago es simple y algo ovalado, el clasper es simple y largo (Lane & Cerqueira, 1942; Lane, 1953; Forattini, 2002; Harbach 2010).

Lane (1953), cita otros caracteres morfológicos para separar el género *Trichoprosopon* de los demás miembros de la tribu Sabethini: Adultos de gran tamaño, esquama con una hilera de cerdas incompleta (excepto en las especies *Tr. longipes*, *Tr. compressum* y *Tr. obscurum*), lóbulos pronotales en posición sublateral respecto a la región media dorsofrontal del tórax (excepto en *Tr. espini*), palpos siempre más de dos veces la longitud del clipeo.

LOS COMPLEJOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Trichoprosopon*

Zavortink (1979a, 1979b), en su redefinición del género *Trichoprosopon* afirma que está integrado por al menos 21 especies, la mayoría de ellas está haciendo parte de uno de los cuatro complejos: Complejo *digitatum*, complejo *lampropus*, complejo *compressum* y el complejo *pallidiventer*. Algunas dificultades para separar las especies son las sutiles diferencias morfológicas que exhiben. En ciertos casos no hay diferencias en algunos estados de desarrollo. También la separación se dificulta debido a que algunas poblaciones son alopátricas (Zavortink, 1981).

Complejo *Trichoprosopon digitatum*

Según Zavortink (1981), el complejo está compuesto de la especie *Tr. digitatum* y al menos dos más sin describir. *Tr. digitatum* es la especie más representativa del género.

Se encuentra ampliamente distribuida desde México (Estado de Veracruz) hasta Ecuador (Estado del Oro) y Sao Paulo, Brasil (Zavortink *et al.* 1983). Ecológicamente presenta hábitats diversos en sus estados inmaduros encontrándose en recipientes de guadua, agujeros en árboles, frutas y cáscaras caídas, bracteas de heliconias y espatas de palma caídas (Galindo *et al.* 1951; Forattini, 2002).

Las especies sin describir del complejo están en simpatria con *Tr. digitatum*, una de ellas en la vertiente pacífica del este de Panamá y Colombia, la otra especie está más hacia el sur en la vertiente pacífica del Ecuador. Solo se conocen los inmaduros de una de las especies sin describir. Éstos han sido encontrados con mayor frecuencia en axilas de hojas el cual no es un hábitat usual de *Tr. digitatum*. Se conocen las diferencias de los estados inmaduros conocidos de las especies sin describir del complejo y *Tr. digitatum* que pueden ser usadas para ilustrar el margen de las diferencias morfológicas que separan especies simpátricas. Para los adultos de *Tr. digitatum*, los escleritos torácicos están definidos, el mesepimeron es de color claro contrastando con una esternopleura oscura y las marcas laterales claras de los terguitos abdominales son ampliadas caudalmente. En las especies nuevas el integumento del mesepimeron es oscuro, así como la esternopleura y las marcas claras laterales de los terguitos no son tan ampliadas caudalmente como en *Tr. digitatum*. Por otro lado, la larva de *Tr. digitatum* la seta 7-P es generalmente simple o doble, mientras que en las nuevas especies es 6-8 ramificaciones. La pupa de *Tr. digitatum* tiene un típico sombreado observado en muchas pupas de mosquitos, siendo la pigmentación de los terguitos más clara en los segmentos posteriores. Las pupas de las especies sin describir tienen un llamativo patrón de manchas oscuras en un fondo claro. Una de las características que permiten distinguir las especies del complejo *Tr. digitatum* es el edeago del macho, el cual posee un diente preapical largo. En la especie reconocida como *Tr. digitatum* el diente va siendo progresivamente mas largo hacia el apice del edeago. En las nuevas especies dicha estructura es progresivamente más pequeña. También se observa que en la genitalia macho de *Tr. digitatum* algunas setas cercuales se aproximan al parche de cercas mayores, pero no es una característica de todas las especies del complejo (Zavortink, 1981).

Zavortink (1981), sugiere que el grado de separación entre las especies del complejo *Tr. digitatum*, dado por las características morfológicas anteriormente descritas, puede ser usado para diferenciar si las poblaciones alopátricas en otros complejos de

Trichoprosopon son realmente especies diferentes. Además, considera que el complejo *Tr. digitatum* permanece que a pesar de la separación de las dos especies sin describir. Lo anterior debido a que hay variaciones muy llamativas dentro del complejo como por ejemplo el caso de 2 hembras gigantes de Guyana y una hembra de palpos inusualmente largos encontrada en lugares montañosos de Colombia, pudiendo ser estos ejemplares representativos de poblaciones con nuevas especies sin describir para el complejo *Tr. digitatum*.

Complejo *Trichoprosopon lampropus*

Zavortink (1981), reconoce dos taxa *Tr. lampropus* y *Tr. evansae*. La diferencia de los adultos de este complejo con los demás del género consiste en la carencia de escamas en el área postspiracular. Con respecto a la ecología de este complejo, sus estados inmaduros se caracterizan por estar presentes solo en agua acumulada en hojas y espaldas de palma caídas. Ambos taxa presentan alopatria, *Tr. lampropus* solo se conoce en Panamá, mientras que *Tr. evansae* esta presente en Colombia y Venezuela. No se ha dilucidado si se trata de dos especies distintas o no.

Tr. lampropus

Adulto con tarsos anteriores generalmente oscuros, los esternitos abdominales poseen una pigmentación débil en forma de línea media longitudinal. Larvas con las ramas de las setas 3-VIII y I-S poco numerosas y bastante pigmentadas. La pupa con la seta 6 de los segmentos II-V mas débil y corta que en *Tr. evansae*. Genitalia del macho con los lóbulos IX-T separados por una marginación en forma de U (Zavortink, 1981).

Tr. evansae

Adulto con los tarsos anteriores de coloración clara y los esternitos abdominales con una línea media longitudinal fuertemente pigmentada. Las larvas presentan las setas 3-VIII y I-S mas numerosas que en *Tr. lampropus* y no son fuertemente pigmentadas y desarrolladas. La pupa presenta la seta 6 de los segmentos II-V fuerte y larga. La genitalia macho tiene los lóbulos IX-T separados por una estrecha marginación en forma de V (Zavortink, 1981).

Zavortink (1981), sugiere que los taxa *Tr. lampropus* y *Tr. evansae* son dos especies diferentes debido a que las diferencias que presentan son comparables con las exhibidas por las especies simpátricas del complejo *Tr. digitatum*. Un muestreo en regiones geográficas localizadas entre los sitios donde se encuentra el rango de distribución del complejo podría mostrar simpatria en algunas áreas y así proveer un estatus específico a cada taxa, o por el contrario, demostrar que ambos taxa son extremos de variación clinal de una sola especie (Zavortink, 1981).

Complejo *Trichoprosopon pallidiventer*

Dentro de los complejos del género *Trichoprosopon*, éste es el de mayor número de taxa y dificultad (Zavortink, 1981). Los miembros de este complejo se diferencian por las siguientes características: Los adultos poseen los tarsos completamente oscuros. Las larvas presentan una mandíbula muy elongada; muchas de las setas del tórax y abdomen son múltiplemente ramificadas particularmente seta 6-I-III, 7-I-II y 2, 4-X; presenta unas pocas escamas en el peine. La pupa presenta la paleta natatoria con un margen aserrado y la seta 4-VIII está en la superficie ventral cerca de la seta 9-VIII Zavortink (1981). El complejo estaría compuesto al menos por 6 especies: *Tr. pallidiventer*, *Tr. castroi*, *Tr. simile*, *Tr. brevipes*, *Tr. andinum* y una sin describir (Zavortink, 1981). Todas ellas se han encontrado criándose en entrenudos de guadua. Al menos tres de las especies pueden estar presentes en una misma área. La especie *Tr. pallidiventer* es la más ampliamente dispersa, común y geográficamente variable. *Tr. castroi* es raramente colectada a pesar de estar ampliamente dispersa. Las otras 4 especies están más restringidas en distribución (Zavortink, 1981).

Complejo *Trichoprosopon compressum*

Según Zavortink (1981), éste complejo está conformado por *Tr. compressum* con dos taxa alopátricos relacionados y *Tr. obscurum* la cual es una especie más distante y simpátrica en relación con *Tr. compressum*. Los estados inmaduros de *Tr. compressum* y los dos taxa alopátricos relacionados son aparentemente indistinguibles, encontrándose todos en entrenudos de guadua. Con respecto a los adultos y la genitalia del macho, estos taxa difieren en mayor medida que las especies simpátricas del complejo *Tr. digitatum*. Zavortink (1981), sugiere que esos taxa alopátricos son especies diferentes y señala la

necesidad de aumentar los sitios geográficos de muestreo para verificar si efectivamente son dos especies.

ALGUNAS ESPECIES DESCRITAS DEL GÉNERO *Trichoprosopon*

Trichoprosopon digitatum (Rondani, 1848)

Caracteres morfológicos: La especie en su estado adulto se caracteriza por la presencia de setas en el clípeo, una hilera incompleta de pelos en la esquama del ala y unas cuantas escamas anchas agrupándose en el medio del postnoto. La descripción de la especie tipo de *Tr. digitatum* fue realizada a partir de una variedad de la especie sin escamas en el clípeo (Zavortink, 1979).

Según la descripción de Lane (1953): **Adulto:** Clípeo con setas únicamente. Esquama del ala con una franja de cerdas incompleta. Pronoto posterior de color violeta en la parte superior, cerca del mesonoto. Posnoto con una agrupación de escamas blancas perla en el área media. Patas medias con los tarsos II, III y IV blancos, V oscuro. Patas posteriores con el fémur y el tarso I con una mancha de escamas blancas en la base. Tarsómero III blanco en el ápice, tarsómeros IV y V completamente blancos. **Genitalia macho:** noveno terguito sin un espacio interlobular y con tres hileras de setas compactas. **Pupa:** sifón corto, expandido apicalmente; abdomen con los segmentos II-IV con la seta B más larga que los segmentos. Paleta natatoria lisa en el ápice, más corta o tan larga como el segmento VIII. Grupo medio de setas del cefalotórax con las setas externas e internas divididas, al menos en cuatro ramas. **Larva:** maxila pequeña, sin diente terminal; mandíbula larga y desarrollada, con dientes terminales oscurecidos. Segmento VIII con una seta fuerte insertada sobre un tubérculo esclerotizado. Placa labial con cuatro o cinco dientes de cada lado; cuerpo con setas insertadas sobre tubérculos.

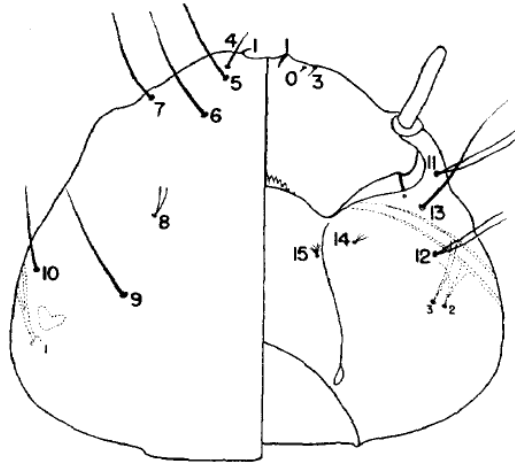


Figura 2: Aspecto dorsal y ventral de la cabeza de la larva de IV Instar de *Tr. digitatum* (Las estructuras y pelos de la pupa se representan en líneas punteadas) (Belkin, 1952).

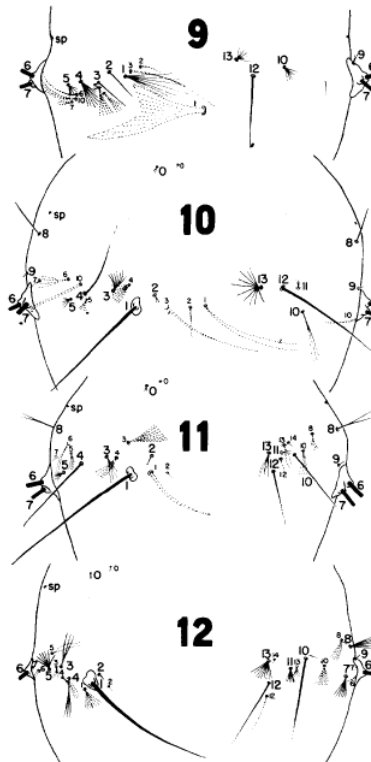


Figura 3: Aspecto dorsal y ventral de los segmentos abdominales I, II, III y IV de *Tr. digitatum* (Belkin, 1952).

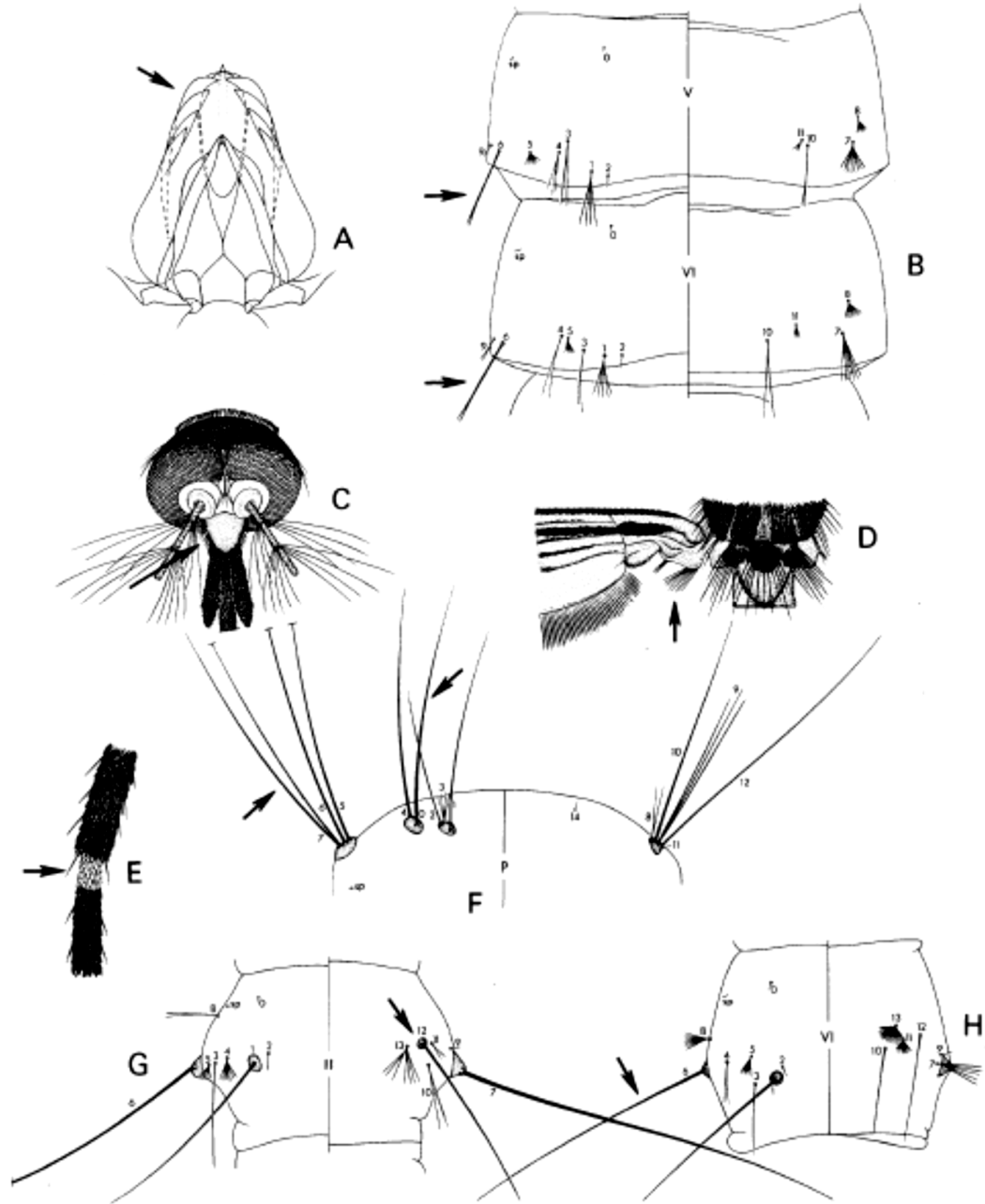


Figura 4: Caracteres diagnósticos de *Tr. digitatum*: A, Edeago; B, Segmento abdominal de la pupa; C, Clípeo en adulto; D, Base del ala; E, Base del segmento tarsal 1; F, Protórax larval; G, Segmento larval abdominal II; H, Segmento larval abdominal IV. Tomado de Zavortink *et al.* 1983.

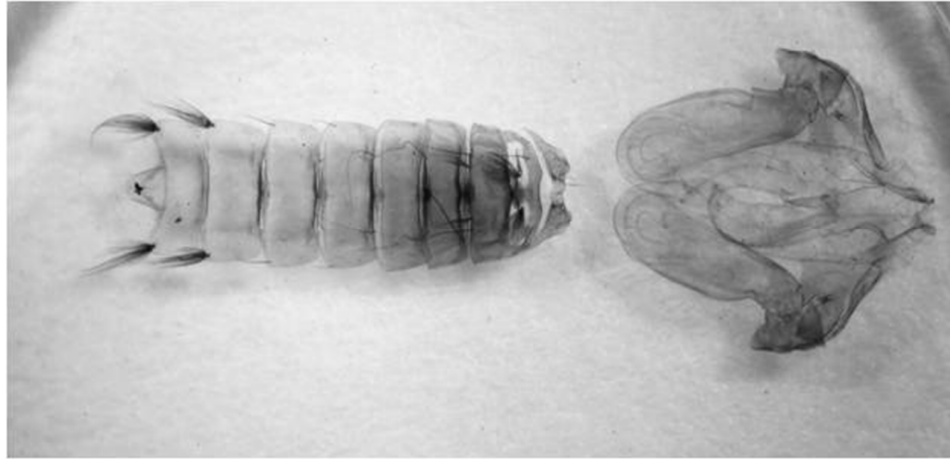


Figura 5. Exuvia de pupa de *Tr. digitatum*. (Suaza *et al.* 2010, sin publicar). Fotografía: Jovany Barajas.

Bionomía

Las larvas se encuentran principalmente en entrenudos de bambú, frutos y nueces caídas, hojas caídas y contenedores artificiales. Estos cuatro tipos de criaderos equivalen al 92% de las clases de hábitat encontradas para *Tr. digitatum* en el estudio “Mosquitos of Middle America” (Belkin, 1965). Otros tipos de fitotelmata donde se pueden encontrar son: huecos de árboles, brácteas de flores como las de heliconia y las axilas de las hojas de las bromelias (Zavortink 1979, Zavortink *et al.*, 1983). Según Zavortink *et al.* (1983) *Tr. digitatum* es una especie común y ampliamente distribuida en los trópicos americanos. La especie es abundante tanto en ambientes domésticos como peridomésticos donde comúnmente puede picar a humanos. El 95% de los mosquitos utilizados en un estudio taxonómico del género *Trichoprosopon* es *digitatum* (Zavortink *et. al.*, 1983).

Importancia Médica

Esta especie se ha señalado como vector de arbovirus tales como Bussuquara (Panamá), Encefalitis de San Luis –SLE (Por sus siglas en ingles) (Colombia y Ecuador), Wyeomyia (Colombia). Para los virus denominados Bussuquara y Wyeomyia, se considera a los mosquitos como reservorios y para SLE se consideran las aves silvestres. La dinámica de transmisión de estos virus es desconocida (AFPMB, 1998).

La transmisión de arbovirus como *Trichoprosopon digitatum*. Esta especie ha sido previamente relacionada en Colombia con la transmisión de los virus Wyeomyia (Aitken *et al.*, 1968), Bussuquara (Galindo *et al.*, 1966), Encefalitis de San Luis (Galindo *et al.*, 1964) e Ilheus (de Rodaniche & Galindo, 1961).

Distribución

Lane (1953), reconoce esta especie para Panamá, El Salvador, Costa Rica, Trinidad, Venezuela, Colombia, Surinam, Guayana Francesa, Brasil, Ecuador, Bolivia, Paraguay, Nicaragua, Guatemala. En los trabajos de Knight & Stone (1977) y Zavortink *et al.* (1983), se incluye la presencia de esta especie en Colombia, y se registra que se distribuye por toda Sudamérica. De igual forma, otras publicaciones como *La Lista de Mosquitos de Colombia* (Barreto-Reyes, 1955) y Notes on the genus *Trichoprosopon* (Diptera: Culicidae) de Stone (1944) reconoce esta especie para Colombia. Al igual, en *el trabajo "Collection Records of the Project "Mosquitoes of Middle America"* se señala que esta especie se encuentra en Colombia en las siguientes localidades: Municipio de San Vicente de Chucurí (Santander), Buenaventura (Valle del Cauca) y Soacha (Cundinamarca).

***Trichoprosopon compressum* Lutz, 1905**

Caracteres morfológicos: Adulto: Proboscis oscura, tres cuartos tan larga como el fémur posterior. Esquama del ala sin cerdas. Clípeo con cerdas laterales, sin escamas. Occipucio con escamas oscuras de brillo plateado. Tórax, con mesonoto alargado, con una cubierta densa de escamas marrón oscuras excepto en el escutelo donde hay escamas verde azules. Postnotum con escamas hialinas. Pleura y pronotum posterior con escamas plateadas. Patas violáceas oscuras. Base de la tibia posterior con un pequeño espacio blanco en la región interna. Ala oscura con escamas anchas, Femur de la pata media mas corto que el de la pata anterior. Palpos 1/5 tan largos como la proboscis.

Genitalia: Basistyle ligeramente menor a tres veces el ancho mayor. Decimo Sternito esclerotizado lateral y apicalmente con tres o cuatro dientes terminales y diez espículas. Mesosoma oval, la apertura basal anterior y grande. **Larva:** Cabeza redondeada, setas dorsales simples excepto la ocho la cual es doble. Antena muy corta, con una seta preapical simple. Mandíbula más grande que la maxila, con cinco dientes oscuros y fuertes. Maxila pequeña y sin dientes. Palpos maxilares bien desarrollados y excediendo la porción superior de la maxila. Cuerpo con el segmento VII con una seta insertada en un gran tuberculo. Sifón tan largo como 1.5 veces el ancho mayor (Lane, 1953).

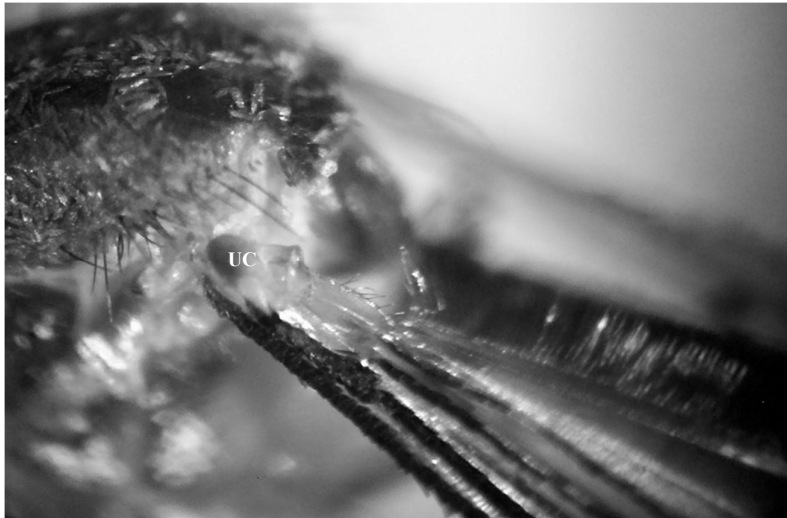


Figura 6: Esquama del ala (UC: "Calypter" superior) sin cerdas. Detalles del ejemplar: Hembra adulta de. *Tr. sp* (Complejo *pallidiventer*) colectada en municipio de Anserma, Antioquia, Colombia. (Suaza et al. 2010, sin publicar). Fotografía: Juan David Suaza V.

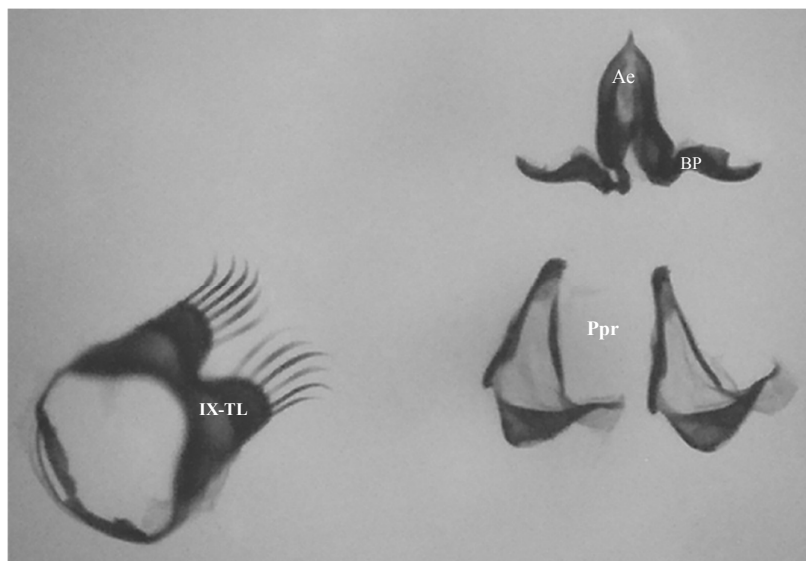


Figura 7: Genitalia macho de *Tr. compressum*: Gs (Gonostilo), Gc (Gonocoxita); IX-TL (IX lóbulo tergal). Ae (Edeago), BP (Pieza Basal); Ppr (Paraprocto) (Gonostilo), Gc (Gonocoxita); IX-TL (IX lóbulo tergal). *Tr. compressum*. (Suaza 2010, sin publicar).

Trichoprosopon sp. Complejo pallidiventer (en proceso de descripción)

Las poblaciones de estos mosquitos fueron encontradas en tocones de guadua en los departamentos de Caldas (Municipio de Anserma) y Antioquia (Municipios de Jardín e Hispania) en Colombia. La identificación de este morfotipo hasta especie no fue posible. Se llegó hasta el complejo *pallidiventer* del género *Trichoprosopon* siguiendo la clave de

Lane (1953). Con la asesoría del Dr. CH. Porter y el Dr. Zavortink (Comunicación personal, 2008) se logró determinar que se trata de una nueva especie de *Trichoprosopon* del complejo *pallidiventer*. Actualmente se está haciendo la descripción de esta especie con base en caracteres morfológicos y moleculares.

A continuación se presenta una descripción inicial que se realizó con base en algunos ejemplares (basado en Lane, 1953):

Caracteres morfológicos: Adulto con una proboscis ligeramente más corta que el fémur anterior. Mesonoto con escamas estrechas. En la hembra las antenas son dos tercios más largas que la proboscis, en los machos la antena es pilosa. Occipucio con escamas que tienen brillo metálico, blancas sobre el mentum. Tarsos oscuros. Tibia posterior sin una mancha más allá de la mitad. En las hembras, los palpos son 0.25 más largos que la proboscis y en los machos son subiguales. Lóbulo pronotal con escamas metálicas; Mesonoto con escamas oscuras delgadas. Scutellum con escamas azul metálicas. Postpronoto con una seta simple, escamas violáceas sobre la punta y por debajo; región prescutelar con un par de setas y escamas azules. Alas con el borde de escamas en la esquama incompleta. Abdomen oscuro sobre el dorso y blanquecino en su superficie ventral. **Genitalia:** espacio interlobal del noveno segmento pequeño, con setas delgadas sobre una línea recta; batistilo con seis largas setas, dos veces tan largo como ancho; lóbulo basal piloso. Uña gonostylar menor que 0.25 el largo del dististilo. Décimo sternito con dos o más dientes apicales. Pupa: abdomen con la seta B sobre todos los segmentos más corta que la longitud de la misma; trompeta corta, expandida en el ápice. Segmento abdominal con la seta C simple, segmento VII sin un tufo anterior. Paleta natatoria pilosa en el ápice y más corta que el VII segmento abdominal, grupo medio de setas sobre el cefalotórax con las externas e internas divididas en al menos cuatro ramas. **Larva:** setas de la cabeza simples, antena muy corta, mandíbula hipertrofiada con dos fuertes dientes apicales y otros cuatro pequeños dientes oscurecidos. Cuerpo suave, con tufos esparcidos de setas cortas las cuales son espiniformes y en roseta. Segmento VIII con tres o cuatro escamas, que son en forma de pequeñas placas con una serie de espinas sobre el margen posterior. Sifón corto, delgado, con tufos de setas en el medio; segmento anal con una placa dorsal pequeña.

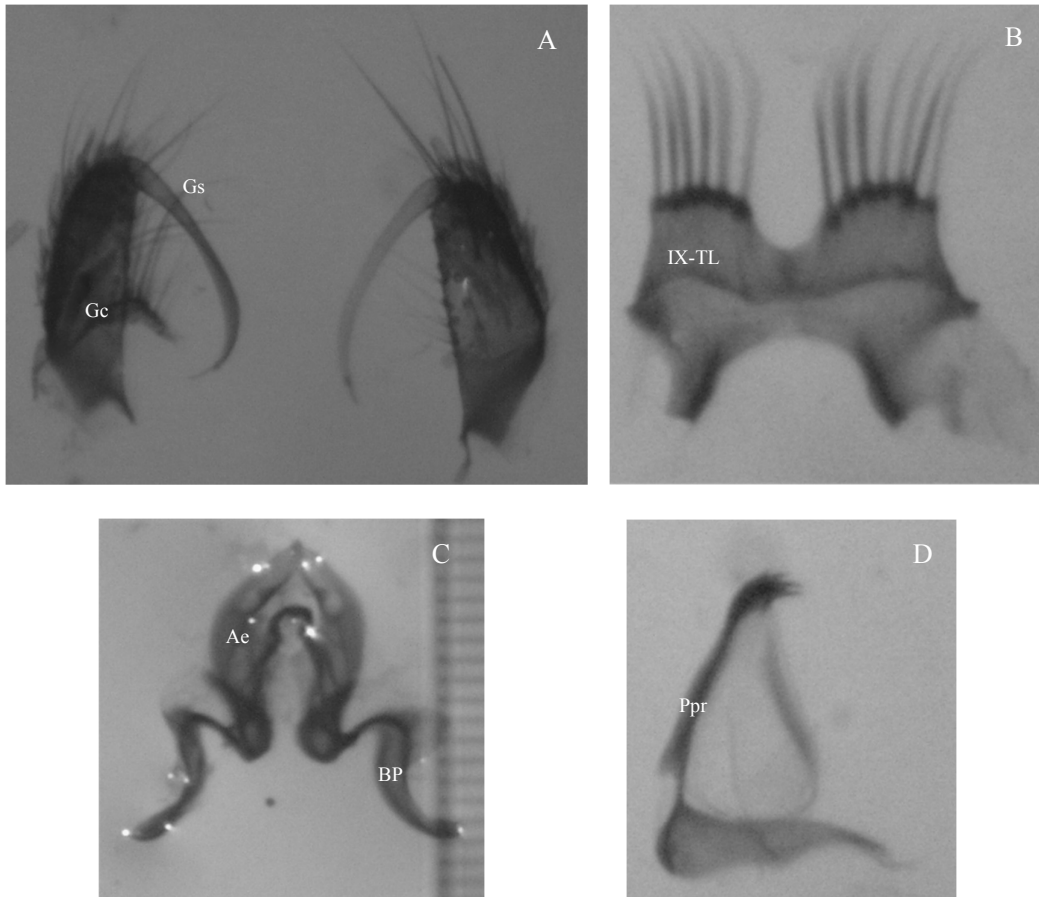


Figura 8: Genitalia macho de *Trichoprosopon* sp. (complejo *pallidiventer*). A: Gs (Gonostilo), Gc (Gonocoxita); B: IX-TL (IX lóbulo tergal); C: Ae (Edeago), BP (Pieza Basal); D: Ppr (Paraprocto) Especie en proceso de descripción. Ejemplar colectado en Jardín, Antioquia, Colombia). (Suaza *et al.* 2010, sin publicar). Fotografía: Juan David Suaza V.

Bionomía

Especie aún no descrita del complejo *pallidiventer*, fue hallada en tocones y entrenudos de guadua perforados en los municipios de Jardín, Hispania y Anserma en Colombia., siendo el primer tipo de criadero el que presentó el mayor número de larvas (Suaza *et al.* 2008).

Distribución

Para Colombia, la especie *Trichoprosopon* sp. Complejo *pallidiventer* fue encontrado en las localidades de Jardín e Hispania (Antioquia) y Anserma (Caldas) en guaduales ubicados en zonas de bosque húmedo premontano y bosque húmedo tropical respectivamente.

2. BIONOMIA DEL GÉNERO *Trichoprosopon*

Los mosquitos de *Trichoprosopon* son considerados silvestres, siendo la hembra notablemente hematófaga. Las larvas se desarrollan en aguas retenidas en entrenudos de guadua, cáscaras de frutos, vainas, heliconias, plantas de las familias Araceae, Bromeliaceae y en perforaciones de tallos de árboles. Muchas especies de *Trichoprosopon* se han encontrado asociados con la guadua y en ecosistemas alterados con altas tasas de deforestación (Galindo *et al.* 1966).

Las larvas de *Trichoprosopon* son considerados de hábito depredador, excepto aquellas especies en las cuales las maxilas son pequeñas y sin diente apical (Lane, 1953). A diferencia de muchas de las larvas de la tribu Sabethini que permanecen bajo el agua por largos periodos de tiempo apoyando su dorso en el fondo del criadero, las de *Trichoprosopon* son nadadoras activas y buscan frecuentemente la superficie del agua para reposar (Zavortink, 1981).

3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El género se distribuyen en áreas tropicales americanas, desde México hasta el norte de Argentina (Zavortink, 1979, Forattini, 2002).

Algunas de las localidades donde han sido colectados ejemplares del género *Trichoprosopon* son:

COLOMBIA

San Vicente de Chucurí (Departamento de Santander): Un total de 1.808 mosquitos del género *Trichoprosopon* fueron capturaron en estaciones localizadas entre 180 y 310msnm. Las capturas se hicieron entre Octubre de 1958, a Julio de 1961. Las especies colectadas fueron *Trichoprosopon digitatum* y *Trichoprosopon longipes* las cuales se atraparon durante el día en su gran mayoría por medio de cebo humano, y otra parte en la noche con trampas Shannon. También se reportaron otras especies de *Trichoprosopon* sin identificar señaladas como *Tr.* spp. (Morales & Vidales, 1962).

BRASIL

Las especies *Tr. pallidiventer* y *Tr. humboldti* fueron colectadas en entrenudos de bambú perforado (entre 1-2 m en estratificación vertical) en un fragmento de bosque localizado en área urbana de Londrina, Paraná. La presencia de estos pequeños parches de bosque en áreas urbanas es suficiente para hospedar especies de algunos Sabethini (Cyrino y Lopes, 2001).

VENEZUELA

Barrera & Villalba (1994) en una investigación realizada en un bosque nublado tropical demostraron que la especie *Tr. evansae* es colonizadora de los tallos de guadua recién caídos, comenzando así un proceso de sucesión seguido por otras especies de Culicidae (*Culex rausseoi*, *Anopheles eiseni* y *Limatus* sp.) debido al cambio en las características del agua por descomposición del criadero natural. La especie *Tr. evansae* resultó ser depredadora facultativa de otros larvas de mosquitos.

4. IMPORTANCIA MÉDICA

Con respecto a la importancia médica del género, *Tr. digitatum* es la especie reconocida como vector de virus en humanos. Algunos de los virus aislados son Wyeomyia y Pixuna. También se han aislado otros virus como Bussuquara, Ilheus y Encefalitis de San Luis a partir de “pools” que incluyen especies del género *Trichoprosopon*.

Algunos estudios específicos con aislamientos virales exitosos son los siguientes: En Panamá, el primer reporte de aislamiento del virus Ilheus fue hecho a partir de mezclas de especies de mosquitos del género *Trichoprosopon* y de la especie *Haemagogus spegazzinni falco* (De Rodaniche & Galindo, 1961).

En Brasil, en 1975 se aisló el virus Anhembi a partir de *pools* de mosquitos de *Phoniomyia pilicauda* y *Trichoprosopon pallidiventer*. Este virus fue ubicado como un nuevo miembro del grupo Bunyamwera (Souza Lopes et al. 1975).

En algunas especies de *Trichoprosopon* diferentes a *Tr. digitatum*, se ha logrado aislar virus. Por ejemplo, el virus Wyeomyia, fue aislado de *Tr. longipes* provenientes de Trinidad (Groot, 1964).

En Sao Paulo, Brasil en un área de montaña (Serra do Mar) a 800 metros de altitud Lopes *et al.* (1975), aislaron el virus Anhembi del grupo Bunyamwera a partir de mosquitos identificados como *Trichoprosopon pallidiventer* capturados con cebo humano y trampas de luz (Natal *et al.* 1998).

Para Colombia se reconoce que la especie *Tr. digitatum* y otras especies *Trichoprosopon* sin identificar estan asociados con la transmisión potencial de agentes causantes de enfermedades en el país (Tabla 2).

Vector/ Enfermedad	Distribución Geográfica	Sesión de Transmisión	Hábitat de la larva	Comportamiento al Picar/ Reservorio de Arbovirus
<i>Trichoprosopon digitatum</i> /Virus de la Encefalitis de San Luis (Colombia, Ecuador), Wyeomyia (Colombia)	Belice, Brasil, Colombia, Cosa Rica, Ecuador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Suriname y Venezuela.	Desconocido	Entrenudos de bambú, frutas caídas, hojas caídas, agujeros en árboles, brácteas de <i>Heliconia</i> , axilas de bromelias y contenedores artificiales.	Pica en humanos, especialmente a nivel del suelo del bosque durante el día. /Aves silvestres, <i>Wyeomyia</i> (mosquito)
<i>Trichoprosopon</i> spp. /Guama (Colombia, Perú)	Colombia, Perú	Durante la estación lluviosa en el bosque de lluvia tropical	desconocido	Desconocido / <i>Oryzomys capito</i> , <i>Coendou</i> spp., <i>Oryzomys laticeps</i> , <i>Heteromys anomalus</i>

Tabla 2: Virus transmitidos por mosquitos del género *Trichoprosopon* en Colombia. Fuente: AFPMB, 1998.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Con respecto a la taxonomía del género *Trichoprosopon*, hace falta hacer muestreos representativos y conocer las fases inmaduras de estas poblaciones como lo sugiere Zavortink (1981) en su trabajo de descripción de los complejos de *Trichoprosopon*. En esta misma publicación, Zavortink sostiene que las dificultades para dilucidar las especies del complejo se basan en la escasez de material biológico, las sutiles diferencias entre especies y el hecho de que algunas de las especies solo son bien diferenciadas en un solo estado de desarrollo. También reconoce que el género *Trichoprosopon* necesita ser

redefinido en su taxonomía debido a que el número de especies y quizá el número de complejos puede cambiar al tener una mayor cantidad de ejemplares disponibles para el estudio del género.

Debido a lo anterior, se sugiere coleccionar mosquitos del género en otras áreas geográficas que estén ubicadas entre los límites establecidos para los complejos. Además, el material biológico debe suministrar información de los diferentes estados de desarrollo de las especies para así conocer un mayor número de caracteres morfológicos que permitan dilucidar y redefinir el estatus de las especies de los complejos del género *Trichoprosopon*. La inclusión de caracteres moleculares en estudios de sistemática molecular de éste grupo proporciona un conocimiento de la filogenia de las especies (Hajibabaei et al. 2007), y contribuye a la delimitación de las especies que hacen parte de los complejos de *Trichoprosopon*.

Por último, la importancia médica que representan las especies de mosquitos desde la reemergencia de virus (Morse, 1995; Figueiredo, 2007) está actualmente está siendo potenciada por los cambios de coberturas vegetales y el cambio climático (calentamiento global). Debido a esto es imprescindible hacer estudios actuales de aislamientos virales a partir de técnicas moleculares de secuenciación, a partir de mosquitos silvestres donde se encuentra el género *Trichoprosopon*.

En Colombia, los estudios que se tiene sobre aislamientos virales a partir de artrópodos (Groot, 1964) son muy antiguos. Esto incluye mosquitos de la tribu Sabethini. Se necesita hacer nuevas investigaciones enmarcadas en el ámbito de la ecología viral partiendo la investigación en áreas anteriormente estudiadas y ampliando el rango de muestreo en áreas de mayor elevación altitudinal.

BIBLIOGRAFÍA

- AFPMB. 1998. Diseases Ecology Profile, Ecuador. Defense pest Management information análisis center. Walter Reed Army Medical Center. Washington, DC.80p.
- Aitken, T.H.G., Hingwan, J.O., Manuel, R. & Hosein, H. 1968. Laboratory colonization of *Trichoprosopon digitatum* (Rondani) (Diptera: Culicidae). *Mosquito News*. 28: 445-454.
- Barrera, R. & Villalba, S. 1994. Sucesión de especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) en espaldas de palma (*Euterpe* sp.) en un bosque nublado tropical. *Acta Biologica Venezuelica* 15 (1): 25-37p.
- Barreto-Reyes, P. 1955. Lista de Mosquitos de Colombia, S. A. (Diptera: Culicidae). *Anales de la Sociedad de Biología de Bogotá*. 7(2): 46-94p.
- Belkin, J.N. 1952. The homology of the chaetotaxy of immature mosquitoes and revised nomenclature for the chaetotaxy of pupa (Diptera, Culicidae). *Proc. Ent. Soc. Wash.* 54(3): 115-130.
- Belkin, J.N., Schick, R.X. & Heinemann, S.J. 1965. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae). V. Mosquitoes originally described from Middle America. *Contributions of American Entomological Institute*. 1(5): 1-95p.
- Belkin, J., Schick, R., Galindo, P. & Aitken, T. 1969. Mosquito Studies (Diptera: Culicidae). I. A project for a systematic study of the mosquitoes of Middle America. *Contributions of American Entomological Institute*. 1(2): 1-17.
- Cyrino, J.A. & Lopes, J. 2001. Culicidae fauna (Diptera) encontrada em entrenós de taquara de uma mata residual na área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 18(2): 429-438p.
- Galindo, P., Srihongse, S., de Rodaniche, E. & Grayson, M.A. 1966. An ecological survey for arboviruses em Almirante, Panamá, 1959-1962. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 15: 385-400.
- De Rodaniche, E. & Galindo, P. 1961. Isolation of the Virus of Ilhéus Encephalitis from Mosquitoes Captured in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 10(3): 393-394p.
- Dyar, H.G. 1928. *The Mosquitoes of the Americas*. Washington. Carnegie Institution of Washington. 387: 616p.
- Eduards, F.W. 1932. *Diptera, Fam. Culicidae. Genera Insectorum*. Belgium. Fascicle 194: 258p.
- Figueiredo, L.T.M. 2007. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(2): 224-229p.
- Forattini, O.P. 2002. *Culicidologia Médica. Volumen 2: Identificação, Biología, Epidemiología*. Universidad de Sao Paulo, Brasil. Editora da Universidade de São Paulo. Brasil. 860p

Frank, J.H. & Curtis, G.A. 1981. On the bionomics of bromeliad-inhabiting mosquitoes. VI. A review of the bromeliad-inhabiting species. Journal of the Florida Anti-mosquito association. 52 (1): 4-23.

Galindo, P., Carpenter, J. & Trapido, H. 1951. Ecological observations on forest mosquitoes of an endemic yellow fever area in Panama. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Baltimore. 31: 98-137p.

Galindo, P., Peralta, P.H., Mackenzie, R.B. & Beye, H.K. 1964. St. Louis encephalitis in Panamá: A review and progress report. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 13: 455.

Galindo, P., Srihongse, S., de Rodaniche, E. & Grayson, M.A. 1966. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panamá, 1959-1962. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 15: 385-400p.

Groot, H. 1964. Estudios sobre virus transmitidos por artrópodos en Colombia. Separata de la Revista de la Academia Colombiana de Ciencias, Exactas Físicas y Naturales. 12(46):1-23p.

Hajibabaei, M. Singer, G. Hebert, P. & Hickey. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics, TRENDS in Genetics. Disponible en Internet desde: <http://www.bolinfonet.org/pdf/2007_-_Hajibabaei_-DNA_barcoding_How_it_complement_s_taxonomy.pdf> [con acceso el 27 de marzo de 2007].

Harbach, R.E. & Kitching, I.J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). Systematic Entomology, 23: 327-370p.

Harbach, R.E. & Peyton, E.L. 2000. Systematics of *Onirion*, a new genus of Sabethini (Diptera: Culicidae) from the Neotropical region. Bulletin of the Natural History Museum of the Entomology Series, 69:115-169p.

Harbach, R.E. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa, 1668: 591-638p.

Harbach, R.E., Vu Duc Huong & Kitching, I.J. 2007. Systematics of *Kimia*, a new genus of Sabethini (Diptera: Culicidae) in the Oriental region. Proceedings of the Entomological Society of Washington, 109: 102-120p.

Harbach, R.E. 2010. Mosquito Taxonomic Inventory. En Internet:<<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/users/ralph-harbach>> [con acceso el 12 de Mayo de 2010].

Judd, D.D. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). Systematic Entomology. 21: 129-150p.

Knight, K.L. & Stone, A. 1977. A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae). Second Edition. San Thomas Foundation, Entomological Society of America, Vol. VI. The Geo. W. King Company. Baltimore, Maryland.

Lane, J. 1953. Neotropical Culicidae, v. II. São Paulo, Universidade de São Paulo, Brasil. 1111p.

Lane, J. & Cerqueira, N.L. 1942. Os sabetinos da America (Diptera: Culicidae). Arch. Zool.S. Paulo, 3: 473-849p.

Oscar De Souza Lopes, O.D.S., Sacchetta, L. D. A., Fonseca, I.E.M. & Lacerda, J.P.G. 1975. Bertioga (Guama Group) and Anhembi (Bunyamwera Group), Two New Arboviruses Isolated in São Paulo, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 24(1): 131-134p.

Morales, A. & Vidales, H. 1962. Distribución de mosquitos selváticos en San Vicente de Chucurí, Colombia. Lozania; 13: 1-16p.

Morse, S.S. 1995. Factors in the emergente of infectious diseases. Emerging Infectious Diseases. 1(1): 7-15p.

Natal, D., Urbinatti, P.R. & Marucci, D. 1998. Arbovirus vector ecology in the brazilian coastal range system. En: An overview of arbovirology in brazil and neighbouring countries. Part 3: Control of vectors and ecology of arboviruses. Eds: Travassos da rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F.C. & Travassos da rosa, J.F.S., Belém, Instituto Evandro Chagas. 233-247p.

Souza Lopes, O.; Sacchetta, L. A.; Fonseca, I. E. & Lacerda, J. P. 1975. Bertioga (Guama group) and Anhembi (Bunyamwera group), two new arboviruses isolated in São Paulo, Brazil. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 4(1):131-134.

Suaza-Vasco, J.D., Uribe, S.I. Barajas, J., Torres, C., Rúa-Urbe, G., Velez, I.D. 2008. Determinación taxonómica de mosquitos de importancia médica (Diptera. Culicidae) asociados a hábitat fitotelmata. Resúmenes (Ponencias) XXXV Congreso SOCOLEN, Colombia. ISBN: 978-958-44

Stone, A. 1944. Notes on the genus *Trichoprosopon* (Diptera, Culicidae). Revista de Entomologia. Rio de Janeiro. 15:335-341.

Udvardi, M.D.F. 1975. A classification of the Biogeographical provinces of the World.IUCN Ocasional paper. No. 18. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Morges, Switzerland. 49p.

Zavortink, T. J. 1979a. A reclassification of the sabethine genus *Trichoprosopon*. Mosq. Syst. 11:255-257.

Zavortink, T. J. 1979b. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae). XXXV. The new sabethine genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. Contrib.Am. Entomol. Inst. (Ann Arbor), 17(1):1-61p.

Zavortink, T. J. 1981. Species complexes in the genus *Trichoprosopon*. *Mosq. Syst.* 13:82-85p.

Zavortink, T.J.; Roberts, D.R. & Hoch, A.L. 1983. *Trichoprosopon digitatum* Morphology, Biology, and potential medical importance. *Mosquito Systematics* 15(2): 141-149p.

3. Lista de distribución del género Neotropical *Trichoprosopon* Theobald, 1901

[Artículo próximo a someter]

Material suplementario I:

Actualización de los registros de presencia y distribución de adultos del género
Trichoprosopon

Lista de distribución del género Neotropical *Trichoprosopon* Theobald 1901 para Colombia

Distribution list of the Neotropical genus *Trichoprosopon* Theobald 1901 in Colombia

JUAN SUAZA-V, CHARLES PORTER, GUILLERMO RUA-URIBE, SANDRA URIBE

Resumen

El género *Trichoprosopon* Theobald está conformado por un grupo de mosquitos de distribución neotropical, ocupando generalmente hábitats rurales y selváticos. Algunas de sus especies han sido encontradas infectadas con arbovirus. Durante el presente trabajo se hizo una revisión de literatura que permitió recopilar y actualizar los registros históricos de especies de *Trichoprosopon* con presencia en Colombia. También se adicionaron registros actuales a partir de material entomológico proveniente de la costa caribe, costa pacífica, montañas altoandinas y valles interandinos de Colombia (periodo 2009-2016). Se hizo una lista actualizada de las especies para Colombia con sus registros de distribución y notas ecológicas. Se registraron siete especies válidas de *Trichoprosopon* [*Tr. andinum* Levi-Castillo, *Tr. compressum* Lutz, *Tr. digitatum* (Rondani), *Tr. evansae* Antunes, *Tr. lampropus* Howard, Dyar & Knab, *Tr. lanei* (Antunes) y *Tr. pallidiventer* (Lutz)] para 10 departamentos de Colombia, ocupando hábitats asociados a presencia de criaderos tipo fitotelmata. Se evidenció la presencia de otras posibles especies que serían parte de los complejos descritos para el género, ambas presentes en ecosistemas cafeteros de montañas altoandinas. Nuevos estudios rápidos de diversidad en áreas que han sufrido cambios en su cobertura y uso del suelo podrían contribuir enormemente a ampliar los registros del género.

Palabras clave: Mosquitos, Sur América, Sabethini, Fitotelmata

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoprosopon* Theobald, 1901 está compuesto por 13 especies de mosquitos con distribución en América Central y del Sur (Harbach 2013). Este género neotropical se ha registrado en los siguientes países: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Guyana Francesa, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Suriname, Trinidad y Tobago, y Venezuela (WRBU 2019). Las especies de *Trichoprosopon* se han encontrado tanto en áreas boscosas como en áreas domésticas y suburbanas (Badii et al. 2006, Marcondes et al. 2003, Yanoviak et al. 2006). Además de estar asociadas a áreas de agricultura como son cultivos de coco y cacao, y guaduales cultivados en áreas urbanizadas

(Barajas et al 2013, Suaza-Vasco et al. 2015). Las hembras de *Trichoprosopon* ovipositan en agua acumulada en tallos de bambú perforados y frutos caídos (ej. cacao, coco). Otros hábitats menos frecuentes son las brácteas florales de *Heliconia* spp. y agujeros en los árboles (Heinemann y Belkin, 1978). Hay reportes de las hembras adultas de *Trichoprosopon* picando a humanos durante el día (Antunes 1936, Komp 1937). Se sabe que algunas de sus especies pueden albergar arbovirus (Aitken et al 1968, King et al 2011, Schlesinger 1980). En Colombia, la especie *Tr. digitatum* se ha vinculado como un vector de virus Wyeomyia (Aitken et al., 1968), Bussuquara (Galindo et al., 1966), encefalitis de San Luis (Galindo et al., 1964) e Ilheus (de Rodaniche & Galindo, 1961). En áreas montañosas de Brasil *Tr. pallidiventer* se encontró infectada con el virus Anhembi (Lopes et al. 1975, Natal et al. 1998).

Las 13 especies reconocidas y validadas para el género *Trichoprosopon* son: *Tr. andinum* Levi-Castillo 1953, *Tr. brevipes* (da Costa Lima 1931), *Tr. castroi* Lane & Cerqueira 1942, *Tr. compressum* Lutz 1905, *Tr. digitatum* (Rondani 1848), *Tr. evansae* Antunes 1942, *Tr. lampropus* (Howard, Dyar & Knab 1913), *Tr. lanei* (Antunes 1937), *Tr. obscurum* Lane & Cerqueira 1942, *Tr. pallidiventer* (Lutz 1905), *Tr. simile* Lane & Cerqueira 1942, *Tr. soaresi* Lane & Cerqueira 1942 y *Tr. vonplesseni* (Dyar & Knab, 1906) (Harbach 2013). Diez de éstas forman parte de alguno de los cuatro complejos nombrados como *Tr. pallidiventer*, *Tr. digitatum*, *Tr. compressum* y *Tr. lampropus*. (Zavortink 1981). Únicamente las especies *Tr. lanei*, *Tr. soaresi* y *Tr. vonplesseni* no son parte de dichos complejos. De estas tres especies solo *Tr. lanei* tiene registro de distribución para Colombia, país donde se describió originalmente.

Algunas especies de estos complejos son alopátricas dentro del rango de su distribución geográfica, presentándose esta situación en Colombia (Zavortink per. com.). Otras especies pueden encontrarse en simpatria. Por ejemplo, *Tr. digitatum* puede ocupar los mismos lugares de reproducción de especies como *Tr. compressum* (Heinemann y Belkin, 1978). Zavortink (1979), menciona que *Trichoprosopon* es un grupo taxonómico difícil, y la identificación errónea de sus especies ha sido común. Esta dificultad para identificar con precisión las especies indudablemente ha dificultado la recopilación y el reporte de información biológica sobre ellas.

A pesar de la importancia médica de algunas de sus especies, especialmente en áreas silvestres y periurbanas, pocos estudios actuales se enfocan en ampliar el conocimiento de los rangos de distribución y actualización de registros del género. En el caso específico de Colombia, no hay estudios centrados en conocer la distribución del género, además los registros existentes son en su mayoría de más de 30 años. Debido a los cambios en el uso de tierras y cambios en las coberturas vegetales del paisaje, es necesario una actualización de los registros de distribución y especies presentes de éste importante grupo de mosquitos. El objetivo de este trabajo es presentar una lista formal y actualizada de las especies válidas del género *Trichoprosopon* para Colombia con énfasis en su distribución, así como anotaciones de su ecología. También se incluye el registro de dos nuevas especies pertenecientes a *Trichoprosopon*, encontradas durante los trabajos hechos en áreas montañosas andinas de Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Obtención de registros de distribución del género *Trichoprosopon*

Los registros del género se obtuvieron a partir de diversas fuentes: *i*) Registros históricos encontrados en la literatura, *ii*) Revisión de sitios web especializados en literatura de la familia Culicidae como son el Catálogo Sistemático de Culicidae (WRBU 2019) y el Inventario Taxonómico de Mosquitos (MTI) (Harbach 2013), y *iii*) Nuevos registros para el género a partir de la identificación taxonómica de recolecciones recientes de mosquitos en Colombia. Con los datos obtenidos se elaboró una lista actualizada de cada una de las especies de *Trichoprosopon* reportadas para Colombia, basada en la lista de nombres válidos para especies de mosquitos (actualizada el 18 de febrero de 2019), disponible en el sitio web MTI (Harbach 2013). Las abreviaturas de los nombres científicos se basan en la lista de abreviaturas para géneros y subgéneros de la familia Culicidae publicada por Reinert (2009). Las coordenadas geográficas de los nuevos registros se obtuvieron utilizando el sistema de coordenadas de referencia World Geodetic System 1984 (WGS84).

b) Identificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó con base en caracteres morfológicos. Se utilizaron las claves taxonómicas para mosquitos neotropicales publicadas por Clark-Gil & Darsie Jr. (1983), Forattini (2002), Gonzales & Carrejo (2009), Lane & Cerqueira (1942), Lane (1953) y Zavortink (1973, 1979). Además de las revisiones, descripciones y anotaciones taxonómicas como son: Belkin (1952), Belkin et al. (1971), Cerqueira (1961), Da Costa Lima (1930), Levi-Castillo (1953), Stone (1944), Xavier & Mattos (1967) y Zavortink (1973, 1979, 1981) entre otras. Después de la revisión de caracteres para la identificación taxonómica con base en la bibliografía mencionada, se hizo un estudio detallado sobre la morfología de adultos e inmaduros (larvas de IV instar, exuvias de larva y pupa) en aquellos especímenes que no fue posible identificar con las claves taxonómicas y descripciones de especies disponibles. La terminología de los caracteres morfológicos sigue a Harbach & Knight (1980).

RESULTADOS

La siguiente es la lista actualizada de especies del género *Trichoprosopon* para Colombia. Se ha organizado de forma que las especies de *Trichoprosopon* se ubiquen en su respectivo complejo, cuando sea el caso. El orden de aparición de la información para cada una de las especies de la lista, es el siguiente: *i*) Nombre científico válido (excepto para las especies nuevas o complejos de especies sin un nombre científico actualmente válido); *ii*) Localidad tipo

(Lt): municipio, departamento, país; *iii*) Distribución en Colombia (D_COL): municipio, departamento [coordenadas geográficas (cg); elevación (e) en metros], incluyendo registros históricos y nuevos registros¹; *iv*) Notas ecológicas (N_ec): lugar de cría de estados inmaduros / cobertura vegetal o uso del suelo / comportamiento de mosquitos y *v*) Distribución geográfica (Dg): países en la región neotropical

Con asterisco (*) se resaltan los nuevos registros para Colombia (municipios y coordenadas geográficas), basados en la revisión de literatura y en la identificación de los ejemplares revisados en la presente investigación.

Género *Trichoprosopon* Theobald, 1901

Complejo *Trichoprosopon pallidiventer*

***Tr. andinum* Leví-Castillo.** (TI) Macuchi, Cotopaxi, Ecuador. (D_COL) [Jericó (Antioquia) (cg) 05°35'06''N/ 75°47'39''W (e) 2044m] (Rosero et al 2017), [Cali (Valle del Cauca) (e) 1300m] (Heineman & Belkin 1978). (N_ec) Tallos de bambú. (Dg) Colombia, Ecuador.

***Tr. pallidiventer* (Lutz).** (TI) Sao Paulo, Brasil. (D_COL) [Puerto Tejada (Cauca) (e) 1000m] (Heineman & Belkin 1978); [Restrepo (Meta) (e) 548m] (Komp 1936, Antunes 1937), [Villavicencio (Meta) (e) 330m] (Heineman & Belkin 1978); [Alcalá (Valle del Cauca) (cg) 4°42'10.6"N / 75°48'1.13"W (e) 1187m] (Suaza-Vasco et al 2015), [Buenaventura (Valle del Cauca) (e) 30-40m] (Heineman & Belkin 1978). (N_ec) Tallos cortados de bambú, contenedores decorativos de bambú / Parches de guadua (guadales), jardines con plantas de guadua o bambú en áreas peridomésticas / Larvas son depredadoras facultativas de otras larvas de Culicidae; hembras adultas picando a humanos durante el día. (Dg) Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana Francesa, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Venezuela.

***Tr. pallidiventer* s.l.** (D_COL) [Ciudad Bolívar (Antioquia) (cg) 4°42'10.6"N/ 75°48'1.13"W (e) 1187m], [*¿Fredonia? (Antioquia) 5°56'9.4"N/ 75°39'51.9"W (e) 619m], [Hispania (Antioquia) *5°45'24.96"N/ 75°54'53.35"W (e) 1042m], [Jardín, Jericó, Támesis (Antioquia)] (Suaza-Vasco et al 2015), [*Venecia (Antioquia) 5°58'15.37"N/ 75°46'19.02"W (e) 1388m]; [Anserma (Caldas) (cg) 5°10'50"N/ 75°40'57"W (e) 798m, *5°13'41.98"N/ 75°46'39.16"W (e) 1558m] (Suaza-Vasco et al 2015), [Chinchiná (Caldas) *4°59'23.51"N/ 75°35'57.21"W (e) 1301m, *4°59'28.95"N/ 75°35'23.76"W (e) 1485m, *4°59'25.15"N/ 75°35'57.83"W (e) 1284m], [Manizales (Caldas) *4°59'24.03"N/ 75°35'57.55"W (e) 1316m]; [Córdoba (Quindío) *4°23'37.16"N/ 75°41'12.37"W (e) 1519 m], [Filandia, Salento (Quindío)] (Suaza-Vasco et al 2015); [Pueblo Rico (Risaralda)] (Suaza-Vasco et al 2015); [*Alcalá (Valle del Cauca) (cg) 4°42'2.77"N/ 75°48'1.13"W, (e) 1185m;

¹ Registros que se publican por primera vez como resultado de la recolección de mosquitos en campo derivados de la presente investigación.

4°42'10.6"N/ 75°48'1.13"W, (e) 1187m; 4°42'11.79"N/ 75°48'1.87"W, (e) 1190m; 4°42'12"N/ 75°48'2.19"W, (e) 1180m]. (N_ec) Entrenudos de guadua, tallos de bambú en el suelo, tocones de guadua, ovitrampas de guadua / Adultos volando en plantaciones de café cercanas a áreas boscosas y en el interior de bosque; volando en potreros cerca a guaduales (zonas cafeteras de los andes). (Dg) Colombia.

Complejo *Trichoprosopon digitatum*

***Trichoprosopon digitatum* (Rondani)**. (TI) Rio de Janeiro, Brasil. (D_COL) [Apartadó (Antioquia) (cg) 7°53'7"N/ 76°35'45"W (e) 93m] (Parra-Henao y Suárez 2012), [*Carepa (Antioquia) (cg) 7°46'25.7"N/ 76°40'13.6"W (e) 57m], [*Envigado (Antioquia) (cg) 6°9'55.33"N/ 75°35'7.61"W (e) 1675m], [Hispania (Antioquia) (cg) 05°45'16"N/ 75°55'09"W (e) 1045m, 05°45'23"N/ 75°54'56"W, (e) 1040m] (Barajas et al 2013), [*La Pintada (Antioquia) (cg) 5°43'26"N/ 76°37'12.07"W (e) 749m, 5°42'54.55"N/ 75°37'16.29"W (e) 781m], [*Maceo (Antioquia) (cg) 6°32'55.1"N/ 74°38'19.1"W (e) 453m, 6°32'24.0"N 74°47'02.4"W (e) 950m], [*Puerto Berrío (Antioquia) (cg) 6°33'2.86"N/ 74°34'8.48"W (e) 506m, 6°32'24"N/ 74°47'2.4"W (e) 950m]; [Anserma (Caldas) (cg) *5°10'50.8"N 75°40'58.8"W (e) 789m, 5°10'43"N/ 75°40'42"W (e) 805m, 5°10'37"N/ 75°40'39"W (e) 814m, 5°10'13"N/ 75°10'13"W (e) 875m, 5°10'23"N/ 75°40'07"W (e) 807m, 5°10'20"N/ 75°40'39"W (e) 833m, 5°13'43.0"N/ 75°46'39.0"W (e) 1583m] (Barajas et al 2013) (Suaza-Vasco et al 2015), [Chinchiná (Caldas) *4°59'23.51"N/ 75°35'57.21"W (e) 1301m, 4°59'29.0"N 75°35'23.8"W (e) 1485m, 4°59'24.0"N 75°35'57.6"W (e) 1285m] (Suaza-Vasco et al 2015); [Solano (Caquetá) (cg) 0°4'16"N/ 72°26'48"W, (e) 250m] (Molina et al 2000); [*Nuquí (Chocó) 5°37'42.9"N/ 77°24'25.9"W (e) 17m]; [Soacha (Cundinamarca) (e) 1600m] (Heinemann y Belkin 1978); [*Santa Marta (Magdalena) (cg) 11°16'27.7"N/ 73°51'43.7"W (e) 26m]; [Restrepo (Meta) (e) 548m] (Komp 1936, Antunes 1937), [Villavicencio (Meta) (e) 600m] (Antunes 1937); [San Vicente de Chucurí (Norte de Santander) (e) 400m] (Heinemann y Belkin 1978); [Alcalá (cg) *4°42'1.74"N/ 75°47'37.77"W (e) 1200m (Valle del Cauca)] (Suaza-Vasco et al 2015), [Buenaventura (Valle del Cauca) (cg) 3°40'N/ 77°5'W (e) ~30m] (Barreto y Lee 1969). (N_ec) Tocones de guadua, agujero de árbol caído (*Ochroma* sp.), hoja de palma caída, cascaras vacías de cacao, axilas de platanillo (*Heliconia* sp.), cocos caídos / Cultivos de cacao y caucho; cultivos de guadua en áreas rurales; guaduales en áreas urbanizadas; cultivos de coco; manglar con palmas y cocos caídos / Focos de mosquitos adultos en hojas de palmeras, hojas y cortezas de árboles; adultos capturados con aspiradores bucales, trampa CDC, trampa shannon y cebo humano; hembras picando a humanos durante el día. (Dg) Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Surinam, Trinidad y Tobago, Venezuela.

Trichoprosopon n. sp. aff. digitatum (D_COL) [Buenaventura (Valle del Cauca) (cg) 3°40'N/ 77°5'W (e) 30-40m] (Heinemann y Belkin 1978). (N_ec) Axilas de hojas de *Calathea* sp. y *Heliconia* sp. / Criaderos en bosque húmedo lluvioso. (Dg) Colombia.

Complejo *Trichoprosopon lampropus*

Trichoprosopon evansae Antunes. (Lt) Restrepo, Meta, Colombia. (D_COL) [Buenaventura (Valle del Cauca) (cg) 3°40'N/ 77°5'W (e) ~30m] (Barreto y Lee 1969). (N_ec) Adultos capturados durante el día atraídos a humano. (Dg) Colombia, Venezuela.

***Trichoprosopon evansae* s.l.** (D_COL) [Jardín (Antioquia) (gc) *5°35'06''N, 75°47'39''W (e) 2044m, 5°36'50''N/ 75°48'58''W (e) 2253-2413m] (Suaza-Vasco et al 2015). (N_ec) Estados inmaduros en brácteas de bromelia y *Xanthosoma* sp. / Adultos capturados con trampa Shannon y jama entomológica. (Dg) Colombia.

Trichoprosopon lampropus (Howard, Dyar & Knab, 1913). (Lt) Panamá (D_COL) [*Anapoima, (Cundinamarca) (e) ~700m] [*La Mesa, (Cundinamarca) (e) ~700m] (Olano et al 2015). (N_ec) Adultos capturados en periodos secos y lluviosos, al interior de escuelas con aspirador eléctrico. (Dg) Brasil, *Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá.

Complejo *Trichoprosopon compressum*

Trichoprosopon compressum Lutz. (Lt) Sao Paulo, Brasil. (D_COL) [Apartadó (Antioquia) (cg) 7°53'7"N/ 76°35'45"W (e) 93m] (Parra-Henao y Suárez 2012); [Anserma (Caldas) (cg) 5°10'13"N/ 75°40'45"W (e) 980m, *5°10'34.7"N/ 75°40'52.1"W (e) 848m] (Suaza_vasco et al 2015); [Restrepo (Meta)] (Antunes 1937, Lane y Cerqueira 1942). (N_ec) Tallos y tocones de guadua / Coberturas de guadua cerca a potreros y cultivos de cítricos / Hembras adultas atraídas a cebo animal y picando a humanos. (Dg) Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Guyana, Panamá, Paraguay, Venezuela.

Otras especies de *Trichoprosopon*²

² Sin relación conocida con los complejos de especies. Según Zavortink (1981) en su publicación de complejos de especies del género *Trichoprosopon*: [... a few of the species, as for example *Tr. lanei*, occupy isolated positions within the genus and do not appear to be particularly closely related to any other species.] p.82.

Trichoprosopon lanei (Antunes). (Lt) Restrepo, Meta, Colombia. (D_COL) [Restrepo (Meta) (e) ~600m] (Antunes 1937). (N_ec) Pupas en guaduas /interior de selva en piedemonte (llanos orientales colombianos) / hembras atraídas a cebo humano durante el día por ejemplo, *Trichoprosopon*, ocupan posiciones aisladas dentro del género y no parecen estar particularmente estrechamente relacionadas con ninguna otra especie. (Dg) Colombia, Ecuador.

Registro de distribución de dos nuevas especies de *Trichoprosopon*

Las dos nuevas especies del género *Trichoprosopon*, las cuales son referidas en el presente documento como *Trichoprosopon* sp. n.e. A y *Trichoprosopon* sp. n.e. B, fueron encontradas en valles altoandinos de Colombia (elevaciones 1300-2515m y 2000m, respectivamente). Todos los estados inmaduros de los ejemplares de la especie *Trichoprosopon* sp. n.e. A se encontraron en tallos de guadua. Los sitios de cría fueron generalmente guaduales ubicados en pastizales (potreros), bordes de bosque en plantaciones de café y en algunos casos áreas urbanizadas con parches de guadua. La especie *Trichoprosopon* sp. n.e. A estuvo presente en 10 municipios pertenecientes a los departamentos de Antioquia (6), Caldas (2), Quindío (1) y Risaralda (1).

La especie *Trichoprosopon* sp. n.e. B se encontró también en un criadero natural, tipo fitotelmata. Se recolectaron larvas y pupas en axilas de la planta *Xanthosoma* sp. (Araceae). La planta estaba bajo sombra en un dique -o drenaje- entre una zona verde arborizada y una calle, localizada a 400m de la cabecera municipal de Jericó. Los estados inmaduros se criaron en el Laboratorio de Fisiología de insectos – Insectario de la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín) donde se obtuvo 1 macho, 2 hembras adultas y una larva que se preservó en ETOH 80% (¿IV? Instar).

Los registros de los sitios de muestreo donde se encontraron ambas especies³, junto con algunas anotaciones ecológicas del sitio de cría se presentan a continuación:

***Trichoprosopon* sp. n.e. A** (Lt) Jardín, Antioquia, Colombia. (D_COL) [*Ciudad Bolívar (Antioquia) (cg) 5°47'51.8"N/ 76°3'45.1"W (e) 1827m], [*Fredonia (Antioquia) (cg) 5°56'57.4"N/ 75°39'43.4"W (e) 1640m], [*Itagüí (Antioquia) (cg) 6°10'00.6"N/ 75°37'43.7"W (e) 1627m], [Jardín (Antioquia) (cg) 5°36'49.0"N/ 75°48'57.0"W (e) 2253, *5°34'58.04"N/ 75°47'37.43"W (e) 2024m, *5°35'3.04"N/ 75°46'6.13"W (e) 2419m, *5°35'5.66"N/ 75°47'37.64"W (e) 2032m, *5°35'15"N/ 75°49'51.6"W (e) 1702m, *5°37'03.6"N 75°50'33.3"W (e) 1961m] (Suaza-Vasco et

³ Las descripciones completas de ambas especies están siendo realizadas con el apoyo de especialistas en el género y serán publicadas oficialmente en revistas especializadas en taxonomía de Culicidae.

al 2015), [*Jericó (Antioquia) (cg) 5°47'10.34"N/ 75°47'22"W (e) 1970m, 5°47'37.49"N/ 75°47'5.71"W (e) 2018m, 5°47' 36.61"N/ 75°47'5.61"W (e) 2044m], [*Sabaneta (Antioquia) 06°09'02"N/ 75°36'43"W (e) 1596m]; [*Chinchiná (Caldas) (cg) 4°59'23.5"N/ 75°35'57.2"W (e) 1301m, 4°59'24.0"N/ 75°35'57.6"W (e) 1320m], [*Manizales (Caldas) (cg) 5°05'34.7"N/ 75°32'23.7"W (e) 1910m]; [*Salento (Quindío) (cg) 4°37'50.15"N/ 75°28'8.07"W (e) 2515m]; [Pueblo Rico (Risaralda) (cg) 5°13'55.11"N/ 76°1'46.82"W (e) 1472m]. (N_ec) Tocones y entrenudos de guadua/ Guadales cercanos a bosques, potreros y cultivos de café en zonas rurales; Guadales en zonas urbanas (ej. placas deportivas, urbanizaciones, instituciones educativas). (Dg) Colombia.

Trichoprosopon sp. n.e. B (Lt) Jericó, Antioquia, Colombia. (D_COL) [*5°47'18.3"N/ 75°47'26.14"W (e) 2002m]. (N_ec) Estados inmaduros en brácteas de *Xanthosoma* sp. (N_ec) Plantas de *Xanthosoma* en canal o dique de casa rural, cerca de potrero y área boscosa (Dg) Colombia.

DISCUSIÓN

El descubrimiento de dos nuevas especies de *Trichoprosopon* en Colombia corrobora las observaciones hechas por Zavortink (1981), donde menciona que podría haber al menos 21 especies, dentro del rango de distribución del género. Según la lista de especie válidas de Harbach (2013) y el catálogo sistemático de Culicidae (WRBU 2019), actualmente solo hay 13 especies formalmente reconocidas para *Trichoprosopon* y 2 Nomina dubia (especies no reconocidas) por falta de evidencia que valide su estatus como especie. Estas aparecen nombradas como *Tr. cotopaxense* con localidad tipo en Ecuador y *Tr. hyperleucum* con localidad tipo en Perú. Para el caso de Colombia, se tiene conocimiento de al menos dos especies más para el género, una es similar a *Tr. andinum* y la otra perteneciente al grupo *pallidiventer*, estando ambas aparentemente presentes en la costa pacífica colombiana. (Zavortink, Porter *com. pers.* 2011).

En una reciente publicación de la lista de especies de mosquitos de Colombia, Rozo y Mengual (2015) registran 6 especies para el género *Trichoprosopon*. Durante ese mismo año, en un estudio de vigilancia entomológica realizado en escuelas de dos localidades del departamento de Cundinamarca (Colombia), se registró por primera vez para Colombia la especie *Tr. lampropus* (Olano et al 2015). En la presente lista se incluyó dicho registro, más aquellos que constituyen especies que están en proceso de descripción (*Trichoprosopon* sp. n.e. A y *Trichoprosopon* sp. n.e. B) y otros nuevos registros que se consideran relevantes porque agrupan ejemplares que exhiben diferencias morfológicas sutiles (*Tr. pallidiventer* s.l. y *Tr. evansae* s.l.) respecto a los complejos de especies previamente descritos. No se incluyó el registro de *Trichoprosopon* del trabajo de Molina et al. (2000) en el parque de Chiribiquete Colombia, donde se hace referencia a *Tr. espini* como especie válida presente en los mosquitos que identificaron. Dicha especie pertenece al género *Isostomyia*, el cual anteriormente estaba considerado como un subgénero de *Runchomyia*

(Zavortink 1979). El estatus de género y algunos estudios morfológicos de los estados inmaduros pueden verse en Harbach y Peyton (1993).

Todo lo anterior muestra que hay una subestimación del conocimiento de la diversidad de especies del grupo en el neotrópico. En Colombia son pocos los registros actuales de especies de mosquitos que sean producto de trabajos sistemáticos en campo, donde se logre realizar muestreos rápidos de diversidad en áreas no exploradas o en áreas que han tenido cambios en el uso del suelo y en el tipo de cobertura vegetal, y que tengan por objeto la identificación taxonómica de mosquitos a partir de series (estados de larva, pupa y adulto).

Agradecimientos

A los grupos de investigación, instituciones y organizaciones con la cuales se han realizado estudios enfocados en conocer la fauna de mosquitos en diferentes partes del territorio de Colombia: Center for Diseases Control (CDC) y el Grupo de Sistemática Molecular (Universidad Nacional de Colombia), con apoyo de los grupos PECET y GEM (Universidad de Antioquia). Entre los años 2009 y 2016 se produjeron una serie de publicaciones de las especies de mosquitos que habitan criaderos naturales en hábitats rurales, selváticos y en menor grado periurbanos. Estos estudios evidenciaron la falta de conocimiento que se tiene de la distribución y presencia de especies de Culicidae en el territorio colombiano.

REFERENCIAS

Antunes, P. C. A. 1937. Informe sobre una investigación entomológica realizada en Colombia. *Revista Facultad de Medicina de Bogotá* 6: 365-387.

Badii, M., Garza, V., Landeros, J. & Quiroz, H. 2006. Diversidad y relevancia de los mosquitos. *Cultura Científica y Tecnológica (CULCyT)*. 3(13): 4-16p.

Barreto P y Vernon L. 1969. Artrópodos hematófagos del Rio Raposo, Valle, Colombia. *Caldasia*, X (49): 407-440.

Galindo, P., Srihongse, S., Rodaniche, E., & Grayson, M. (1966). An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959-1962. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 15 (3), 385-400.

Harbach, R.E. 2013. Mosquito Taxonomic Inventory, http://mosquito-taxonomic-inventory.info/sites/mosquito-taxonomic-inventory.info/files/Valid%20Species%20List_69.pdf, accedido el 21 de marzo de 2019.

Harbach & Knight 1980. Taxonomists' glossary of mosquito anatomy. New Jersey, USA. 415p.

Harbach, R.E. & Peyton, E.L. (1993) Morphology and evolution of the larval maxilla and its importance in the classification of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, 25, 1–16.

Heinemann, S.J. & Belkin, J.N. 1978. Collections Records of the Project “Mosquitoes of Middle America” 12. Colombia (COA, COB, COL, COM). *Mosquitoes Systematics*. 10(4): 493-539p.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ., *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 2011 San Diego Elsevier.

Marcondes, C.B., Fernandes, A., Paterno, U., Müller, G.A., Pinho, L.C. & Struffaldi, D.V. 2003 New records of mosquitoes from the southern Brazilian states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul, with 18 species new for the States (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*, 347:1-6.

Molina, J., Hildebrand, P., Olano, V., Muñoz de Hoyos, P., Barreto, M., & Guhl, F. (2000). Fauna de insectos hematófagos del sur del Parque Natural Nacional Chiribiquete, Caquetá, Colombia. *Biomédica*, 20(4), 314-26.

Olano VA, Matiz MI, Lenhart A, Cabezas L, Vargas SL, Jaramillo JF, Sarmiento D, Alexander N, Stenström TA, Overgaard HJ. Schools as Potential Risk Sites for Vector-Borne Disease Transmission: Mosquito Vectors in Rural Schools in Two Municipalities in Colombia. *J American Mosquito Control Association*. 2015 Sep;31(3):212-22.

Parra-Henao, G. & Suárez, L. (2012) Mosquitoes (Diptera: Culicidae) as potential arbovirus vectors at the Urabá region, north-occident of Colombia. *Biomédica*, 32, 252–262.

Reinert JF (2009). List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *European Mosquito Bulletin* 27: 68-76.

Rosero-García D, Rúa-Uribe G, Correa MM, Conn JE, Uribe-Soto S. Mosquito (Diptera: Culicidae) grouping based on larval habitat characteristics in high mountain ecosystems of Antioquia, Colombia. *J Vector Ecol*. 2018 Jun;43(1):71-79.

Rozo-Lopez, P., & Mengual, X. (2015). Updated list of the mosquitoes of Colombia (Diptera: Culicidae). *Biodiversity data journal*, (3), e4567. doi:10.3897/BDJ.3.e4567

Reinert JF (2009). List of abbreviations for currently valid generic-level taxa in family Culicidae (Diptera). *European Mosquito Bulletin* 27: 68-76.

Rubio-Palis Y. & Zimmerman R.H. 1997. Ecoregional classification of malaria vectors in the neotropics. *Journal of Medical Entomology*. 34(5): 499-510.

Schlesinger RW, editor. *The Togaviruses*. Academic Press; New York: 1980. pp. 241–316.

SIB- Sistema de Información sobre Biodiversidad en Colombia. (2013) Available from: <http://www.sibcolombia.net/web/sib/home> (accessed 28 August 2014).

Suaza-Vasco J, López-Rubio A, Galeano J, Uribe S, Vélez I, Porter C. The Sabethines of Northern Andean Coffee-Growing Regions of Colombia. *J Am Mosq Control Assoc*. 2015 Jun;31(2):125-34.

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU) (2019) Systematic catalog of Culicidae, http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3425 (Accessed 27 March 2019).

Wiens J. J. (2011). The niche, biogeography and species interactions. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1576), 2336–2350. doi:10.1098/rstb.2011.0059

Yanoviak SP, Paredes JE, Lounibos LP, Weaver SC 2006. Deforestation alters phytotelm habitat availability and mosquito production in the Peruvian Amazon. *Ecol Appl* 16: 1854-1864.

Zavortink, T. J. 1979. *Mosquito Studies (Diptera, Culicidae)*. XXXV. The new sabethine genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. *Contr. Am. ent. Inst.* 17(1). 61 p.

4. Nueva especie de *Trichoprosopon* en Colombia

[Artículo próximo a someter]

Nueva especie de *Trichoprosopon* en Colombia

New species of *Trichoprosopon* in Colombia

JUAN SUAZA-V, SANDRA URIBE, CHARLES PORTER

Resumen

Dentro del género neotropical *Trichoprosopon* hay un número considerable de especies que forma parte del complejo *Tr. pallidiventer*. Este complejo se distingue de los demás porque sus adultos poseen patas con tarsos completamente oscuros, las larvas tienen mandíbulas alargadas y setas ramificadas múltiples en tórax y abdomen, y en la pupa las paletas natatorias son de borde aserrado. En este trabajo se describe una nueva especie para el complejo, *Trichoprosopon jardinensis* sp. nov., la cual fue encontrada en fragmentos de guadua localizados en áreas rurales de regiones altoandinas de Colombia. Se incluyen los registros de distribución y notas ecológicas para la nueva especie.

Palabras clave: Andes, fitotelmata, mosquito, complejo *pallidiventer*

Abstract

Within the Neotropical genus *Trichoprosopon* there is a considerable number of species that is part of the *Tr. pallidiventer* complex. This complex is distinguished from the others because its adults have legs with completely dark tarsi, the larvae have elongated jaws and multiple branched setae in the thorax and abdomen, and in the pupa the swimming paddles are of serrated edge. In this work we describe a new species for the complex, *Trichoprosopon jardinensis* sp. nov., which was found in fragments of guadua located in rural areas of high Andean regions of Colombia. Distribution records and ecological notes for the new species are included.

Keywords: Andes, phytotelmata, mosquito, *pallidiventer* complex

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoprosopon* Theobald es un grupo de mosquitos con distribución Neotropical que pertenece a la tribu Sabethini Blanchard, la cual se caracterizan por incluir los mosquitos con mayor diversidad estructural y biológica (Judd 1996). Sus adultos exhiben una coloración vistosa y generalmente vuelan durante el día, cerca de sus lugares de cría. Los estados inmaduros se encuentran asociados a hábitats fitotelmata (Yanoviak 2006, Louton 1996). *Trichoprosopon* puede distinguirse de otros géneros de Sabethini por sus larvas con el maxilar no modificado y la ausencia de seta 8-M; Adultos con una proboscis corta y ausencia de una banda clara post-mediana en la tibia III (Zavortink 1979). El género está constituido por 13 especies válidas de las cuales seis tienen registros para Colombia (Rozo-López & Mengual 2015). Sin embargo, se tiene evidencia de que hay al menos 21 especies, muchas de ellas haciendo parte de alguno de los cuatro complejos de especies de *Trichoprosopon* (Zavortink 1981).

El complejo *Tr. pallidiventer* está ampliamente disperso en el neotrópico, en localidades de geografía variable. Para Colombia se tiene registro de las especies *Tr. andinum* Leví-Castillo y *Tr. pallidiventer* (Lutz), dos de las cinco especies válidas del complejo. La primera se encontró a 1300m de altura en el departamento del Valle del Cauca (Heinneman & Belkin 1978), mientras que *Tr. pallidiventer* se ha reportado en elevaciones que van desde los 30m (Heinneman & Belkin 1978) hasta 1195m (Suaza-Vasco et al 2015). Un estudio reciente ha reportado la presencia de *Tr. andinum* a una altura de 2044m en la zona cafetera andina del suroeste antioqueño (Rosero et al 2018). Sin embargo, este registro debe corroborarse ya que antes se había reportado presencia de mosquitos similares a *Tr. pallidiventer* s.s. en esa misma área, referidos por Suaza-Vasco et al (2015) como *Tr. pallidiventer* s.l. La identificación hecha por Rosero et al (2018) estuvo basada en algunos patrones de coloración de adultos descritos en la publicación de Leví-Castillo (1953),

y en el caso de larvas y pupas en observaciones muy generales como fueron: cabeza redondeada y sifón pequeño (larva), paletas natatorias pequeñas y trompetas cónicas pequeñas (Rosero com. Pers.). Dada la falta de otros caracteres informativos como es la genitalia del macho y la observación de la ubicación y tipo de setas en la larva de IV instar y en la pupa, en el presente trabajo no se considerará el registro de *Tr. andinum* reportado por Rosero et al (2018) como válido. Dicho registro se va a tratar como *Tr. pallidiventer* s.l., con la particularidad de que la especie registrada por Rosero posee tarsos claros.

Suaza-Vasco et al (2015), reportaron dos posibles nuevas especies de *Trichoprosopon* (*Trichoprosopon* sp. A y *Trichoprosopon* sp. B), afines a especies ya descritas, pero con diferencias morfológicas importantes que ameritaban hacer una comparación de éstas con material tipo de las especies *Tr. pallidiventer* y *Tr. andinum*. Debido a la dificultad de acceso a los ejemplares tipo de las especies del complejo *Tr. pallidiventer* y al mal estado de muchos de los montajes de adultos y fases inmaduras que componen dicho material, solo se logró la descripción de la primera de ellas. Para ello, se contó con la asesoría de los investigadores Thomas Zavortink (especialista en el género *Trichoprosopon*) y Charles Porter (especialista en grupos de la tribu Sabethini). La descripción de la segunda especie (*Trichoprosopon* sp. B) está siendo completada para su posterior publicación.

A continuación, se presenta la descripción formal de una nueva especie de *Trichoprosopon* referida antes por Suaza-Vasco et al (2015) como *Trichoprosopon* sp. A, especie que proviene de regiones montañosas cafeteras de los andes colombianos. Datos sobre la bionomía y localidades de la especie también son referidos en el presente documento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los especímenes utilizados para la descripción de las dos nuevas especies provienen del material entomológico de la familia Culicidae recolectado durante los años 2007 hasta 2016 en diferentes regiones de Colombia (Barajas et al 2013, Suaza et al 2015, Rosero et al 2017). Para el muestreo se siguió la metodología de búsqueda y recolecta de mosquitos propuesta por Belkin et al. (1969). Para la cría en laboratorio y obtención de las series (exuvia de larva, exuvia de pupa y adulto) a partir de los estados inmaduros, se siguió el protocolo de Gaffigan & Pecor (1997). Se georreferenciaron todos los sitios de muestreo utilizando el sistema de coordenadas de referencia World Geodetic System 1984 (WGS84).

La identificación de los ejemplares adultos se basó principalmente en la genitalia del macho. Esta estructura fue teñida, diseccionada y fijada en placa portaobjeto, utilizando como medio de montaje euparal. También se procedió a hacer el mismo tipo de montaje con las larvas de cuarto instar y exuvias de larva y pupa. El material identificado fue depositado en el MEFLG— Museo Entomológico Francisco Luis Gallego, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Se destacan las siguientes referencias bibliográficas para la identificación y comparación de los ejemplares procesados: Lane and Cerqueira (1942), Lane (1953), Leví-Castillo (1953), Forattini (1965), Zavortink (1979, 1981), Clark-Gil and Darsie (1983), Judd (1996) y Forattini (2002).

Adicionalmente se accedió a valiosa información, proporcionada por el Dr. Zavortink, referente a datos de distribución, fotos y dibujos de parte del material tipo de especies del complejo *Tr. pallidiventer* y otras cercanas. Los acrónimos usados para los repositorios de las colecciones de insectos que se mencionan en este trabajo, están referidos de acuerdo a Evenhuis (2014).

RESULTADOS

Descripción taxonómica

Trichoprosopon jardinensis Suaza-Vasco, Uribe & Porter sp. nov.

[Figs. 1-7]

2015. *Trichoprosopon* sp. A [Jardín (Antioquia) (cg) 5°36'49.0"N/ 75°48'57.0"W (e) 2253, *5°34'58.04"N/ 75°47'37.43"W (e) 2024m, *5°35'3.04"N/ 75°46'6.13"W (e) 2419m, *5°35'5.66"N/ 75°47'37.64"W (e) 2032m, *5°35'15"N/ 75°49'51.6"W (e) 1702m, *5°37'03.6"N 75°50'33.3"W (e) 1961m] (Suaza-Vasco et al 2015)

HEMBRA (fig.1-2, 4): **Cabeza:** Palpos alargados, 0.32-0.34 la longitud de la proboscis. **Tórax** (fig. 3): Setas dorsocentrales (DS), supra-alares (SaS) y escutelares (MSS, LSS) oscuras y bien desarrolladas. Porción central del área prealar (PrA) desprovista de escamas, con integumento cobrizo claro. Escamas escutelares medias y laterales anchas, de color azul iridiscente. Fila de setas mesokatepisternales inferiores (MkSL) proyectadas dorsalmente sobre el borde ventral del mesanepimeron (Msm). **Patas:** Patas I-III con tarsómeros de escamas oscuras.

MACHO (fig. 3, 4): Básicamente como la hembra, excepto por los caracteres sexuales. Los palpos pueden ser semejantes o iguales al largo de la proboscis.

GENITALIA MACHO (fig. 5): **Segmento IX:** Lóbulo del tergito más ancho que largo. Setas del lóbulo 5-8, la mayoría gruesas y bien desarrolladas, otras más delgadas y finas, con la región apical aplanada semi-curva y filamentosa.

PUPA (fig 6): El número de ramas para las setas de la pupa se detalla en la tabla 1.

LARVA (fig. 7): La distribución y tipo de ramificación de las setas es similar al de otras especies del complejo *Tr. pallidiventer*, aunque presenta variaciones en algunas setas. Las principales diferencias con otras especies se discuten en la sección de sistemática.

SISTEMÁTICA: *Trichoprosopon jardinensis* sp. nov. puede distinguirse de las demás especies formalmente descritas para el género por el conjunto de los siguientes caracteres: en el **adulto** por: *i*) los palpos largos en las hembras (~1/3 la longitud de la proboscis), *ii*) en las patas todos los tarsómeros son escamas oscuras. En la **genitalia macho** *i*) Falosoma ovalado y alargado en comparación con *Tr. pallidiventer* s.s. en el cual es mucho más redondeado, *ii*) Segmento IX con una clara hendidura en forma de “U”, mucho más profunda y definida que la observada en la especie *Tr. pallidiventer* s.s., separando los lóbulos del IX tergito; **Pupa** se caracteriza por: *i*) en el cefalotórax la seta 1-CT con 8 ramas (rango 4-9), 10-CT con dos ramas (rango 1-4) *ii*) en la región abdominal, la seta 1-VII generalmente simple, 5-IV-VII es igual o más larga que 2-IV-VII, 5-IV-VI generalmente simple (moda 1), y 6-IV con 2 ramas (rango 1-4).

BIONOMÍA: Todos los estados inmaduros de los ejemplares de la especie *Trichoprosopon jardinensis* sp. nov., se encontraron en tallos de guadua. Los sitios de cría fueron generalmente encontrados al interior de relictos de guadua en áreas rurales, cerca de pastizales y potreros, bordes de bosque secundario y plantaciones de café. En algunos casos, se hallaron ejemplares en áreas urbanizadas con fragmentos de guadua cercanos. Las hembras adultas se observaron volando con frecuencia durante el día, cerca de los lugares de cría. Pueden picar a humanos y animales (perro y caballo).

DISTRIBUCIÓN: La especie ha sido encontrada en diez municipios de Colombia, pertenecientes a los departamentos de Antioquia, Caldas, Quindío y Risaralda. Todos ellos con paisajes típicos montañosos andinos de la región cafetera. Las localidades puntuales donde se realizaron las colecciones del material son: Jardín, Antioquia, Colombia. (D_COL) [Ciudad Bolívar (Antioquia) (cg) 5°47'51.8"N/ 76°3'45.1"W (e) 1827m], [Fredonia (Antioquia) (cg) 5°56'57.4"N/ 75°39'43.4"W (e) 1640m], [Itagüí (Antioquia) (cg) 6°10'00.6"N/ 75°37'43.7"W (e) 1627m], [Jardín (Antioquia) (cg) 5°36'49.0"N/ 75°48'57.0"W (e) 2253, 5°34'58.04"N/ 75°47'37.43"W (e) 2024m, 5°35'3.04"N/ 75°46'6.13"W (e) 2419m, 5°35'5.66"N/ 75°47'37.64"W (e) 2032m, 5°35'15"N/ 75°49'51.6"W (e) 1702m, 5°37'03.6"N 75°50'33.3"W (e) 1961m] (Suaza-Vasco et al 2015), [Jericó (Antioquia) (cg) 5°47'10.34"N/ 75°47'22"W (e) 1970m, 5°47'37.49"N/ 75°47'5.71"W (e) 2018m, 5°47' 36.61"N/ 75°47'5.61"W (e) 2044m], [Sabaneta (Antioquia) 06°09'02"N/ 75°36'43"W (e) 1596m]; [Chinchiná (Caldas) (cg) 4°59'23.5"N/ 75°35'57.2"W (e) 1301m, 4°59'24.0"N/ 75°35'57.6"W (e) 1320m], [Manizales (Caldas) (cg) 5°05'34.7"N/ 75°32'23.7"W (e) 1910m]; [Salento (Quindío) (cg) 4°37'50.15"N/ 75°28'8.07"W (e) 2515m]; [Pueblo Rico (Risaralda) (cg) 5°13'55.11"N/ 76°1'46.82"W (e) 1472m].



Figura 1. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., Hembra adulta —Vista lateral—

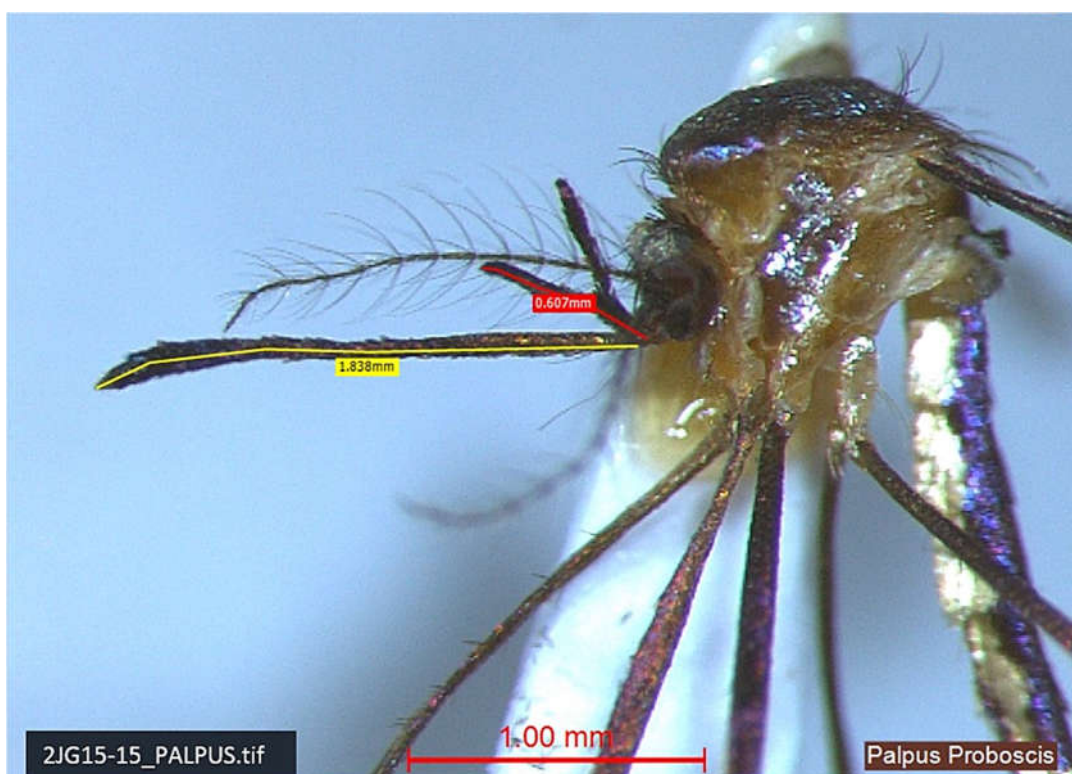


Figura 2. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., Hembra, relación palpos y proboscis —Vista lateral—



Figura 3. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., Macho adulto —Vista lateral—



Figura 4. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., Macho y hembra adulta, tórax —Vista dorsal—

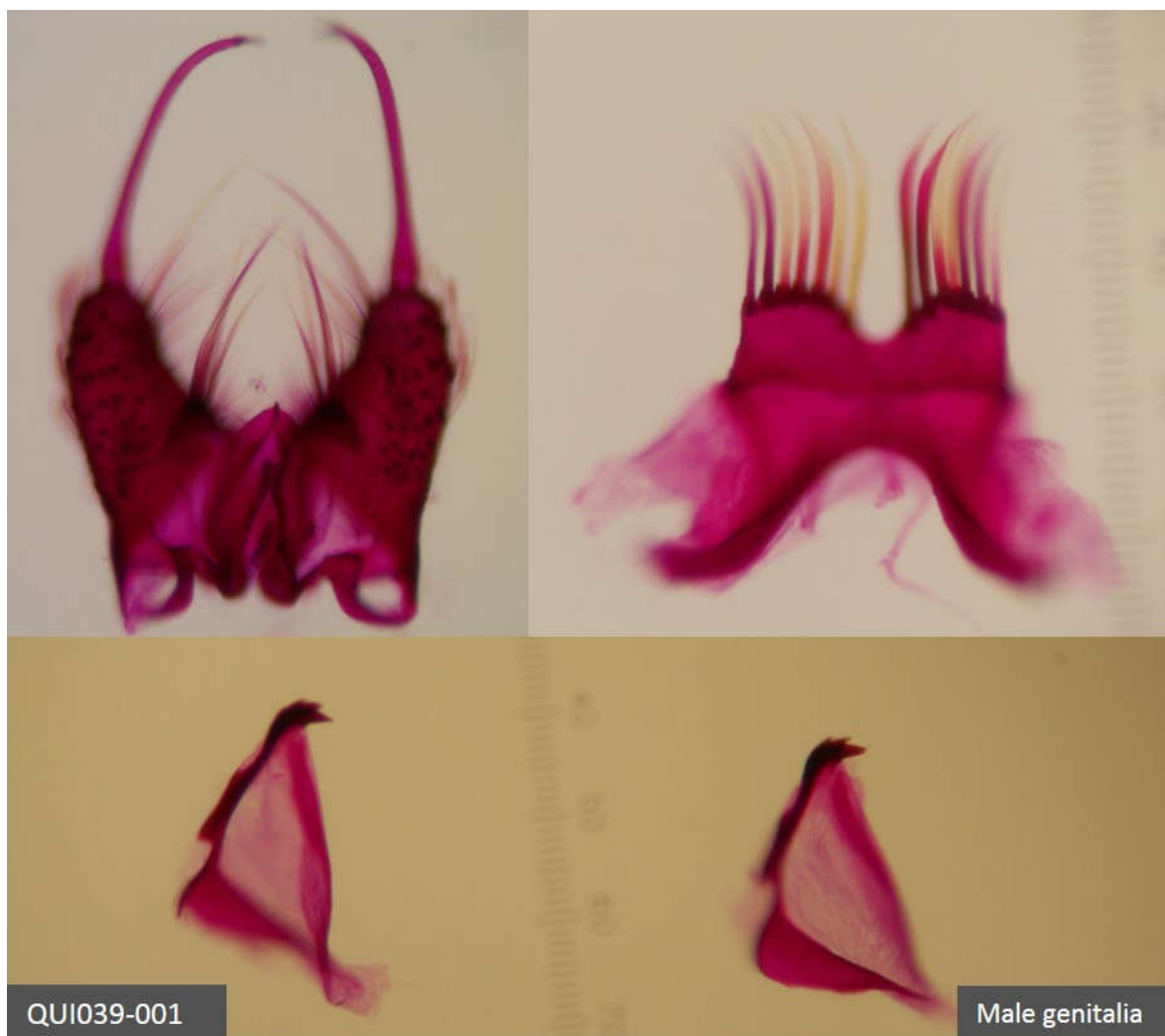


Figura 5. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., genitalia macho.

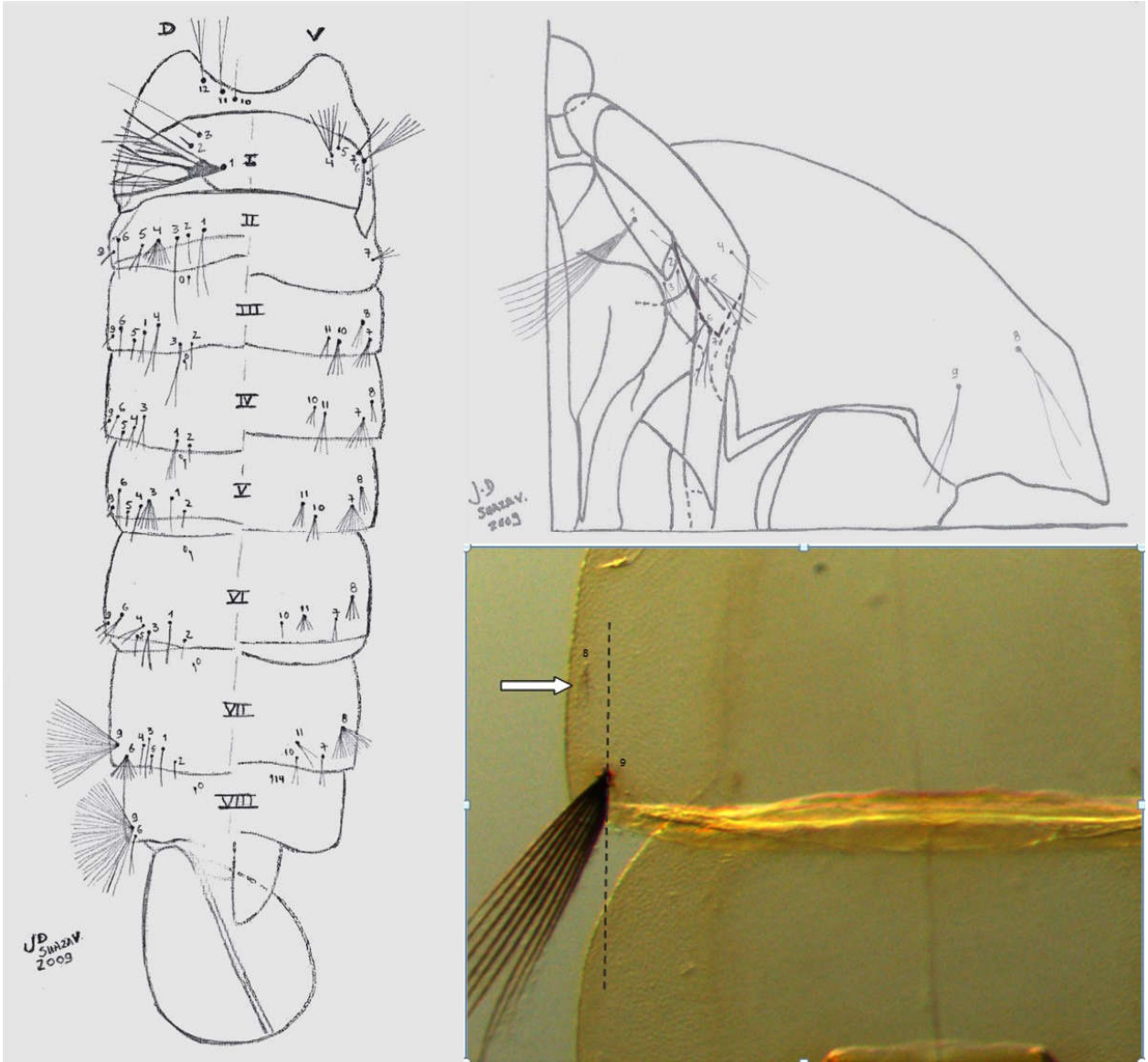


Figura 6. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., Pupa

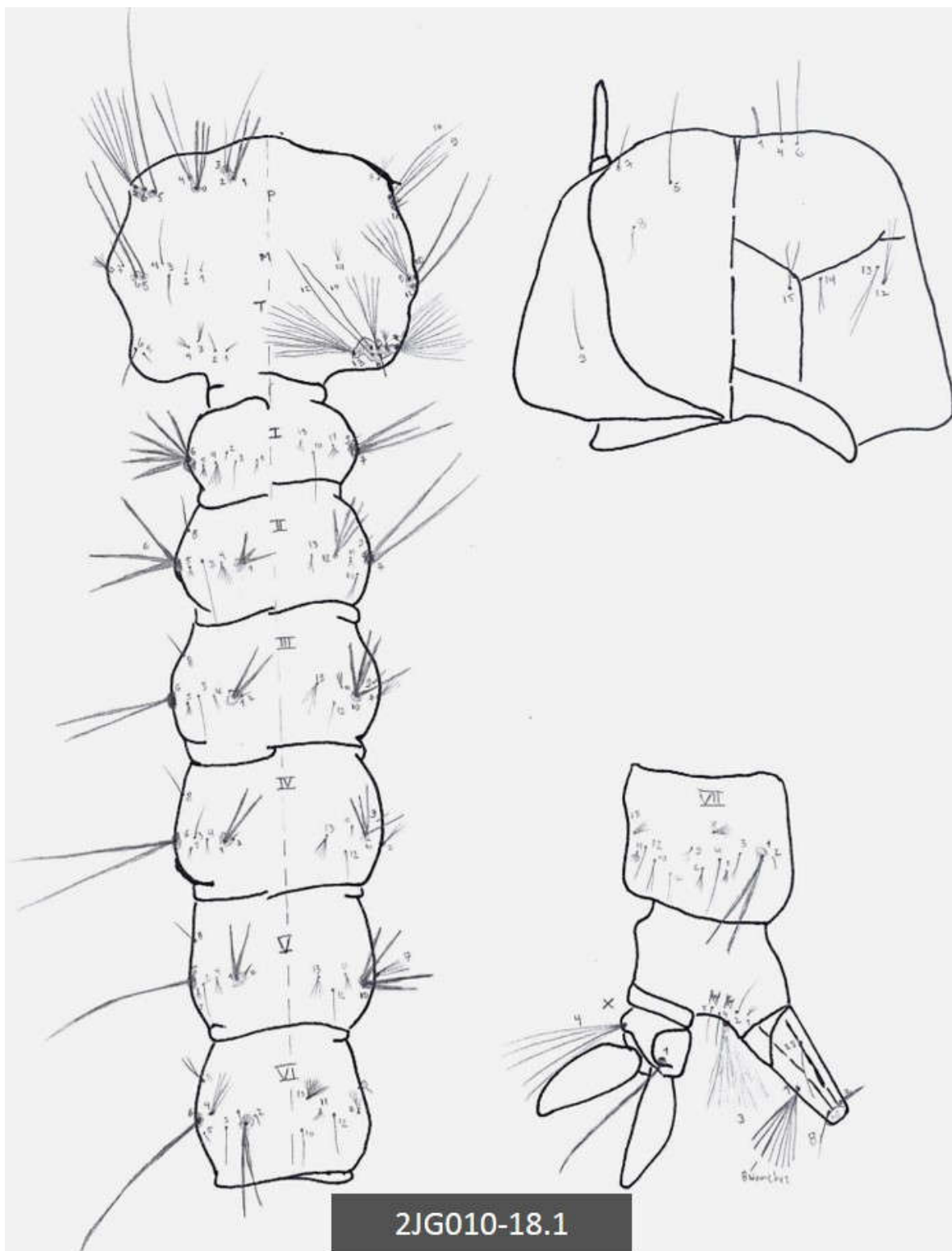


Figura 7. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., Larva Instar IV.

Tabla 1. *Trichoprosopon jardinensis* sp.nov., número de ramas para las setas de la pupa

Seta No.	Cephalothorax		Abdominal Segments						
	CT	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0	-	-	1	1	1	1	1	1	1
1	4-9 (8)	3-6 (4)	1-3 (2)	1-3 (1)	1-3 (2)	1,2 (1)	1-3 (1)	1,2 (1)	-
2	2-5 (2)	1,2 (1)	1	1	1	1	1	1	-
3	2,3 (2)	1	1	2,3 (2)	2-6 (4)	1,2 (1)	1-3 (2)	1,2 (1)	-
4	1-4 (2)	4-8 (5)	5-10 (7)	2-5 (3)	1-4 (2)	4-10 (4)	1-4 (2)	1	1,2 (1)
5	2-6 (2)	1-3 (2)	1-5 (2)	1-3 (1)	1-3 (1)	1,2 (1)	1,2 (1)	2-4 (2)	-
6	2-7 (3)	2-4 (2)	1-4 (2)	1-3 (1)	1-4 (2)	2-6 (2)	2-5 (2)	2-8 (6)	-
7	2-7 (3)	3-6 (5)	3-6 (4)	5-8 (6)	3-8 (6)	6-17 (10)	2-4 (2)	1-3 (2)	-
8	2-4 (2)	-	-	2-5 (3)	1-5 (3)	2-4 (3)	3-6 (5)	6-15 (14)	-
9	1-3 (2)	1,2 (1)	1	1	1	1	1,2 (1)	9-23 (20)	23-35 (32)
10	1-4 (2)	-	-	2-7 (4)	3-6 (3)	2-5 (4)	1-3 (1)	2,3 (2)	-
11	2-5 (2)	-	-	2-4 (2)	1-4 (2)	2-6 (3)	3-6 (4)	2-4 (2)	-
12	2-4 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	1

¹ El rango seguido en paréntesis por la moda; basado en 11 especímenes (22 setae).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Thomas por proporcionarnos la información de algunas de las especies tipo de *Trichoprosopon* y otras especies que actualmente se encuentran bajo su revisión. A los grupos de investigación PECET (Universidad de Antioquia) y GSMUN (Grupo de Investigación en Sistemática Molecular), especialmente a los estudiantes e investigadores que hicieron parte de los trabajos de campo y cría en laboratorio de los ejemplares colectados de Culicidae.

REFERENCIAS

Judd, D. (1996) Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology*, 21 (2), 129–150.

Yanoviak SP, Paredes JE, Lounibos LP, Weaver SC 2006. Deforestation alters phytotelm habitat availability and mosquito production in the Peruvian Amazon. *Ecol Appl* 16: 1854-1864.

Louton, J., Gelhaus, J., & Bouchard, R. (1996). The Aquatic Macrofauna of Water-Filled Bamboo (Poaceae: Bambusoideae: Guadua) Internodes in a Peruvian Lowland Tropical Forest. *Biotropica*, 28(2), 228-242. doi:10.2307/2389077

Zavortink, T. (1979) A reclassification of the sabethine genus *Trichoprosopon*. *Mosquito Systematics*, 11, 255–257.

Zavortink, T. J. 1981. Species complexes in the genus *Thichoprosopon*. *Mosquito Systematics* 13 (1): 82-85

Heinemann, S. J.; Belkin, J. N. 1978. Collection records of the project “Mosquitoes of Middle America”. 12. Colombia (COA, COB, COL, COM). *Mosquito Systematics* 10 (4): 493-539

Rozo-Lopez, P., & Mengual, X. (2015). Updated list of the mosquitoes of Colombia (Diptera: Culicidae). *Biodiversity data journal*, (3), e4567. doi:10.3897/BDJ.3.e4567

Suaza-Vasco, J., A. López-Rubio, J. Galeano, S. Uribe, I. Vélez, and C. Porter. 2015. The sabethines of Northern Andean coffee-growing regions of Colombia. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 31: 125–134.

Belkin, J. N.; Schick, R. X.; Galindo, P.; Aitken, T. H. G. 1969. *Mosquito Studies (Diptera: Culicidae)*. I. A project for a systematic study of the mosquitoes of Middle America. *Contribution of the American Entomological Institute* 1 (2): 1-17

Rosero-García, D. , Rúa-Urbe, G. , Correa, M. M., Conn, J. E. and Uribe-Soto, S. (2018), Mosquito (Diptera: Culicidae) grouping based on larval habitat characteristics in high mountain ecosystems of Antioquia, Colombia. *Journal of Vector Ecology*, 43: 71-79. doi:10.1111/jvec.12285

Levi-Castillo R. Dos especies nuevas de mosquitos de la sierra ecuatoriana (Diptera-Culicidae). *Rev Ecuatoriana Entomol Parasitol.* 1953;1:63-70. 60.

Rosero-García, D., S. Bickersmith, J. Suaza-Vasco, C. Porter, M. Correa, J. Conn, and S. Uribe-Soto. 2017. Molecular operational taxonomic units of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in high Andean mountain ecosystems of Antioquia, Colombia. *Zootaxa*. 4277: 369–385.

Barajas J, Suaza J, Torres C, Rúa G, Uribe S, Porter CH. 2013. Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia. *Rev Col Entomol* 6:132–140

Gaffigan, T.; Pecor, J. 1997. *Collecting, rearing, mounting and shipping mosquitoes*. Walter Reed Biosystematics Unit, Division of Entomology, Walter Reed Army Institute of Research

Lane, J.; Cerqueira, N. L. 1942. Os Sabetíneos da América (Diptera: Culicidae). *Arquivos de Zoologia de Sao Paulo* vol. III.

Lane, J. 1953. Neotropical Culicidae. Vol. 2. São Paulo, Press in University of São Paulo, 1112 p.

Forattini, O. P. 1965. Entomologia Médica. Culicini: *Haemagogus*, *Mansonia*, *Culiseta*, *Sabethini*, *Toxorhynchitini*, arboviroses, flarirose bancroftiana, genética. São Paulo: Editora da USP. v. 3, 415p

Clark-Gil, S. & Darsie, R.F. 1983. The Mosquitoes of Guatemala. Their Identification, Distribution and Bionomics, With Keys to Adult Females and Larvae in English and Spanish. Mosquito Systematics. 15(3):151-284.

Forattini, O.P. 2002. Culicidologia Médica. Volumen 2: Identificação, Biología, Epidemiología. Universidad de Sao Paulo, Brasil. Editora da Universidade de São Paulo. Brasil. 860p.

Zavortink T. The new sabethine genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. Contrib Am Entomol Inst. 1979;17(1):p1-61.

Evenhuis, N.L. (2014a) Abbreviations for insect and spider collections of the world. Available from: <http://hbs.bishopmuseum.org/codens/codens-inst.html> (accessed 09 april 2019)

5. Género *Trichoprosopon*: Análisis desde la perspectiva de la secuencia del código genético de barras *cox1*

[Artículo próximo a someter]

Material suplementario II:

Especímenes recolectados y usados en el procesamiento molecular.

Género *Trichoprosopon*: Análisis desde la perspectiva de la secuencia del código genético de barras *cox1*

Genus *Trichoprosopon*: Analysis using DNA barcode sequence *cox1*

JUAN SUAZA-V, LUIS LÓPEZ, ANDRÉS LÓPEZ, JACOBO PINEDA, SANDRA URIBE

Resumen

El género *Trichoprosopon* Theobald, (1901) –*Tr.* constituye un género de mosquitos de la familia Culicidae, ubicado taxonómicamente en la tribu Sabethini Blanchard, (1905) con distribución neotropical. Algunas de sus especies se consideran potenciales transmisores de arbovirus y sus sitios de desarrollo larval son generalmente fitotelmata de común ocurrencia en localidades de importancia agrícola o en regiones con ecoturismo. En países como Colombia, esto facilita el contacto humano-mosquito con implicaciones epidemiológicas que pueden ir más allá de las molestias ocasionadas por las picaduras y que generalmente son desconocidas por las autoridades locales de salud y medio ambiente. En el presente estudio se realizó un análisis para validar la utilidad de las secuencias de ADN del llamado código genético de barras *cox1*, para diferenciar especies del género *Trichoprosopon* difíciles de separar con base en criterios morfológicos que hacen parte de complejos de especies de común ocurrencia en el país. Se encontró correspondencia entre las especies previamente determinadas por morfología con la ayuda de un especialista y los grupos generados con base en las secuencias de ADN. En un análisis de distancias genéticas Neighbor Joining (NJ) se obtuvieron 9 grupos moleculares (MOTUS), representando el mismo número de especies incluyendo 3 del complejo *Tr. pallividenter*, una del complejo *Tr. digitatum*, una nueva especie denominada *Trichoprosopon* sp. n.e B y 4 del género *Johnbelkinia* –*Jb.* el cual se separó tiempo atrás de *Trichoprosopon* proponiéndose como un nuevo género, pero que en el presente análisis no se diferenció molecularmente del mismo. La especie *Trichoprosopon* sp. n.e B se encontró más relacionada con las agrupaciones de *Johnbelkinia* que con las de *Trichoprosopon*.

Las distancias genéticas intraespecíficas e interespecíficas sugieren la región de ADN usada como una herramienta de uso práctico y eficiente para la separación de especies en ambos géneros, por ejemplo, en programas de vigilancia entomológica.

Palabras Clave: *Trichoprosopon*, arbovirus, código genético de barras, *cox1*, neotropical, complejo *Tr. pallividenter*.

Abstract

The genus *Trichoprosopon* Theobald (1901) -*Tr.* constitutes a genus of mosquitoes of the family Culicidae, located taxonomically in the tribe Sabethini Blanchard, (1905) with neotropical distribution. Some of their species are considered to be potential transmitters of arboviruses and their larval state sites are generally phytotelmata of common occurrence in places of agricultural importance or in regions with ecotourism. In countries like Colombia, this facilitates human-mosquito contact with epidemiological implications that can go beyond the inconvenience caused by bites and that are generally unknown by local health and environmental authorities. In the present study, an analysis was carried out to validate the usefulness of the DNA sequences of the so-called *cox1* barcode, to differentiate species of the genus *Trichoprosopon* difficult to separate based on morphological criteria that are part of species complexes of common occurrence in the country. Correspondence was found between the species previously determined by morphology with the help of a specialist and the groups generated based on the DNA sequences. In an analysis of genetic distances Neighbor Joining (NJ) 9 molecular groups were obtained (MOTUS), representing the same number of species including 3 of the *Tr. palliventer* complex, one of the *Tr. digitatum* complex, a new species called *Trichoprosopon* sp. n, e B and 4 of the genus *Johnbelkinia* -*Jb.* which was separated some time ago from *Trichoprosopon* proposing itself as a new genus, but which in the present analysis did not differ molecularly from it. The species *Trichoprosopon* sp. n.e B was found more related to the groups of *Johnbelkinia* than with those of *Trichoprosopon*. Intraspecific and interspecific genetic distances suggest the region of DNA used as a practical and efficient tool for the separation of species in both genders, for example, in entomological surveillance programs.

Keywords: *Trichoprosopon*, arbovirus, DNA barcode, *cox1*, neotropical, *Tr. palliventer* complex.

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoprosopon* -*Tr.* Theobald, (1901) es un género de mosquitos de la familia Culicidae, ubicado taxonómicamente en la tribu Sabethini Blanchard, (1905). La presencia de esta tribu en ecosistemas cafeteros de Colombia fue revisada por Suaza *et al* (2015), señalando al menos 8 especies de *Trichoprosopon*. Estas especies fueron: *Tr. compressum*, *Tr. digitatum*, *Tr. evansae*, *Tr. andinum*, *Tr. pallidiventer* s.s. y *Tr. pallidiventer* s.l. y dos especies en proceso de descripción nombradas como *Tr. sp. ne A* y *Tr. sp. ne B*.

A pesar de que el género está presente y es de común ocurrencia en el país, hay relativamente pocos estudios sobre su taxonomía e importancia médica, lo cual puede relacionarse con la prioridad otorgada a estudios en mosquitos de otros géneros como *Aedes* y *Anopheles*, con especies de importancia en la transmisión de enfermedades como dengue y malaria respectivamente

(Cabezas *et al* 2017). Algunas de las especies de *Trichoprosopon* se consideran potenciales transmisores de arbovirus, siendo la más importante *Tr. digitatum* pero se conocen más de 13 arbovirus asociados al género (Galindo *et al* 1951; Rodaniche y Galindo 1956; Shope *et al* 1964; Galindo *et al* 1966; Yuill 1986; Hastrister *et al* 1998; Auguste *et al* 2010).

Los sitios de desarrollo larval del género *Trichoprosopon* son generalmente fitotelmata (bromelias, bambú entre otros), de común ocurrencia en localidades de importancia agrícola o con desarrollo ecoturístico (Rodríguez *et al* 2009). En países como Colombia, donde los inmaduros del género se desarrollan frecuentemente en guadua muy abundante en las regiones cafeteras, se facilita el contacto hombre-mosquito en el desarrollo de las actividades en plantaciones de uso agroforestal, además de aquellas relacionadas con construcción e infraestructura que usan guadua y en las fincas cafeteras y su entorno, donde hay gran desarrollo y actividad turística (Contreras-Gutiérrez *et al* 2014).

La mayoría de las especies del género *Trichoprosopon* son morfológicamente similares y algunas hacen parte de complejos de especies. Dichas especies generalmente presentan dificultades taxonómicas cuando su identificación se realiza con base en caracteres morfológicos de solo uno de sus estados biológicos de desarrollo que casi siempre son los adultos (Zavortink 1979a, 1979b; Harbach 2007, 2014).

Dentro de los complejos del género *Trichoprosopon*, el complejo *Tr. pallidiventer* es el de mayor número de taxa y dificultad. El complejo estaría compuesto al menos por 6 especies: *Tr. pallidiventer*, *Tr. castroi*, *Tr. simile*, *Tr. brevipes*, *Tr. andinum* y una más presumiblemente sin describir. Todas ellas se han encontrado criándose en entrenudos de guadua y al menos tres pueden estar presentes en una misma área geográfica en simpatria. La especie *Tr. pallidiventer* es la más ampliamente dispersa, común y geográficamente variable (Zavortink 1981).

Otro complejo de especies del género es el *Tr. digitatum*, según Zavortink (1981), el complejo está compuesto por la especie *Tr. digitatum* y al menos dos más sin describir. *Tr. digitatum* es la especie más representativa del género y se encuentra ampliamente distribuida, ocupando un rango desde México (Estado de Veracruz) hasta Ecuador (Estado del Oro) y Sao Paulo, Brasil (Zavortink *et al* 1983).

Ecológicamente las especies del complejo presentan hábitats diversos en sus estados inmaduros encontrándose en recipientes de guadua, agujeros en árboles, frutas y cáscaras caídas, brácteas de heliconias y espatas de palma caídas (Galindo *et al* 1951; Forattini 2002).

Algunos autores han realizado revisiones importantes sobre la taxonomía y sistemática del género, considerando caracteres de adultos e inmaduros, proponiendo su reclasificación y creando un nuevo género desde *Trichoprosopon* con base en sutiles diferencias morfológicas (Zavortink 1979a, 1979b). Este género se conoce como género *Johnbelkinia* (Zavortink 1979a).

Desafortunadamente la mayoría de estudios del género *Trichoprosopon* son poco recientes y es claro que para países como Colombia donde el panorama sobre los virus emergentes y reemergentes es complejo debido a procesos como la expansión de la frontera agrícola que alteran las dinámicas naturales de los ecosistemas, estudios sobre la culicidofauna y en particular sobre géneros potencialmente vectores de virus, son prioritarios (Cueto 2011).

En el presente estudio se revisó la utilidad de la secuencia de ADN propuesta como código genético de barras en especies animales *cox1*, para obtener MOTUS (Unidades taxonómicas significativas diagnosticadas con base en datos moleculares) en el género *Trichoprosopon* y relacionarlas con las especies identificadas previamente por morfología con la ayuda de un especialista, así como para asignar, de ser posible, los inmaduros y adultos no identificados a una entidad taxonómica o MOTU. Esto último sería de gran utilidad para estudios donde ocurren abundantes colectas de inmaduros en campo, cuyos individuos podrían identificarse rápidamente por medio de códigos de barras genéticos.

Para este grupo de mosquitos como para otros con estudios previos, se consideró que esta secuencia pudiera constituir un apoyo en los estudios de taxonomía y sistemática del grupo, aspectos sobre los cuales hay aún, mucho por resolver.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Colecta de especímenes

Los especímenes provinieron de colectas en 15 municipios y 5 departamentos de Colombia así: Antioquia (Ciudad Bolívar, Fredonia, Hispania, Itagüí, Jardín, Jericó y Venecia), Caldas (Anserma, Chinchiná, Manizales), Chocó (Acandí), Quindío (Córdoba, Quimbaya, Salento) y Valle del Cauca (Alcalá). Las colectas se realizaron usando metodologías previamente descritas en Suaza *et al*, (2015). La identificación morfológica fue realizada con base en las claves taxonómicas disponibles: Zavortink 1979a, 1979b, 1981; Lane and Cerqueira 1942; Clark-Gil y Darsie 1983; Harbach 1994; Judd 1996; Harbach y Kitching 1998; Forattini 2002; Harbach 2007) y verificada por el especialista Charles Porter.

b) Obtención de secuencias código de barras en adultos e inmaduros

Para la extracción de ADN, en adultos, se utilizaron dos patas, mientras que en los especímenes encontrados en estado larval se utilizaron pequeñas fracciones abdominales. El ADN se extrajo de cada uno de los especímenes utilizando el método de macerado de Collins *et al* (1987), adaptado por Uribe *et al* (1998) y Uribe *et al* (2001) en un volumen de elución final de 50 μ L. Un fragmento de 650–700 pb de la región del código de barras *cox1* se amplificó usando los oligonucleótidos descritos por Kumar *et al* (2007).

La amplificación mediante Reacción en cadena de la polimerasa, por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30 μL , incluidos 6 μL de GoTaq® 5X buffer (Promega), 1.2 μL de dNTP (2.5 mM), 0.48 μL de MgCl_2 (25 mM), 0.6 μL de cada primer, 0.18 μL de ADN polimerasa GoTaq® y 2 μL de ADN purificado. Todas las amplificaciones por PCR se verificaron utilizando electroforesis en un gel de agarosa al 1% con Gelstar® (Lonza), solo los productos de PCR positivos se purificaron para la secuenciación utilizando un colector de vacío MultiScreen®HTS (EMD Millipore).

La secuenciación de ADN se realizó en ambos sentidos para cada producto de PCR positivo utilizando el kit de secuenciación BigDye 3.1® (ThermoFisher Scientific), en una reacción de 10 μL que incluyó 2 μL de tampón de dilución ABI 5X, 0,5 μL de Big Dye, 1 μL de primer y 2 μL del producto de PCR, ambas cadenas fueron secuenciadas.

Cada reacción de secuenciación se purificó utilizando el kit de purificación BigDye XTerminator® (ThermoFisher Scientific) utilizando 45 μL de solución SAM, 10 μL de XTerminator y ciclo de secuenciación de 2 μL para cada muestra. Finalmente, todas las muestras se analizaron en un secuenciador capilar automatizado ABI 3500XL® (Applied Biosystems). La calidad de la secuencia se evaluó con Sequence Scanner 1.0® (Applied Biosystems 2011) en base a los estimadores de calidad CRL y QV20.

c) Análisis de secuencias

Los cromatogramas obtenidos se editaron con Geneious® 6 (Kearse *et al* 2012) para generar la secuencia consenso de cada espécimen. Las secuencias de ADN fueron alineadas con la herramienta Muscle (Edgar 2004), incorporado a MEGA X software (Kumar *et al* 2018).

La brecha en el código de barras de la variación intra e inter-especies se estimó a partir de distancias genéticas basadas en el modelo Kimura dos Parámetros (K2P) (Kimura 1980) que distingue entre transiciones y transversiones (Kimura 1980), disponible en MEGA X.

Un dendrograma de distancias, usando el modelo K2P con 10000 repeticiones bootstrap, Neighbor-Joining (NJ) fue generado para proporcionar una representación gráfica del patrón de agrupamiento (MOTUS) entre las distintas secuencias correspondientes a adultos y las obtenidas a partir de larvas (Saitou y Nei 1987). Se usó como grupo externo secuencias obtenidas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con códigos KT766493.1 y AF380835.2 correspondientes a un *Haemagogus lucifer* y un *Aedes aegypti* respectivamente.

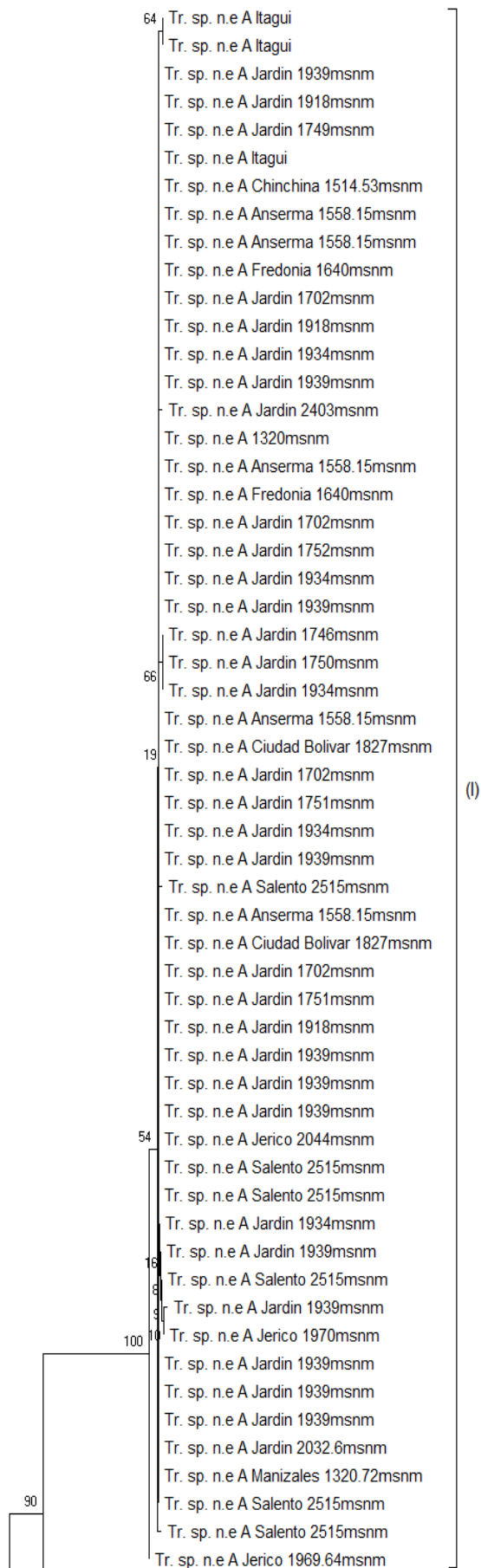
De igual manera se generó un árbol filogenético por el método Maximum Likelihood (ML), usando el modelo General Time Reversible (GTR) (Nei M y Kumar 2000) además de sitios invariantes (I) y distribución Gamma (G) (GTR + I + G) con 1000 repeticiones de bootstrap.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 92 secuencias de ADN de la región Kumar del marcador *cox1* que correspondieron al mismo número de individuos analizados. El tamaño de la región amplificada correspondió a 643 pb. (Figura 1).

El análisis de NJ mostró 9 MOTUS que correspondieron con las identificaciones previamente realizadas por morfología así: con base en adultos se identificaron las especies, *Tr. pallidiventer* s.s. *Tr. pallidiventer* s.l. *Tr. digitatum*, *Jb. leucopus* y *Jb. ulopus* incluyendo además dos especies nuevas en proceso de descripción con base en criterios morfológicos. Estas fueron nombradas en el presente estudio como *Trichoprosopon* sp. n.e A y *Trichoprosopon* sp. n.e B. El análisis molecular indicó la presencia de 3 posibles especies en el complejo *Tr. pallidiventer*, que incluyó las especies *Trichoprosopon* sp. n.e A, *Tr. pallidiventer* s.s. y *Tr. pallidiventer* s.l. Así mismo se observó una clara separación entre los individuos de las especies de los complejos *Tr. pallidiventer* y *Tr. digitatum*. Los especímenes identificados como pertenecientes al género *Johnbelkinia* se ubicaron en 4 agrupaciones, dos de las cuales corresponden a *Jb. ulopus* (Grupo VI en Figura 1) y *Jb. leucopus* (Grupo IV) respectivamente. Una tercera agrupación corresponde a 4 larvas identificadas como *Johnbelkinia* sp. (Grupo V), las cuales están más relacionadas con *Jb. leucopus* (Grupo IV) que con cualquier otra especie del género. La cuarta agrupación se identificó por morfología como *Jb. ulopus* (Grupo VII), sin embargo, la distancia genética respecto al grupo VI sugiere que podría tratarse de una nueva especie en este género. La especie *Trichoprosopon* sp. n.e B se encontró más estrechamente relacionada con los especímenes y agrupaciones del género *Johnbelkinia* que con los individuos del género *Trichoprosopon*. Las agrupaciones de *Jb. leucopus* (Grupo IV) y las 4 larvas identificadas molecularmente como *Johnbelkinia* sp. (Grupo V) están más relacionadas con las especies del complejo *Tr. pallidiventer* (Grupos I, II y III).

El análisis de NJ mostró 9 MOTUS que correspondieron con las identificaciones previamente realizadas por morfología así: con base en adultos se identificaron las especies, *Tr. pallidiventer* s.s. *Tr. pallidiventer* s.l. *Tr. digitatum*, *Jb. leucopus* y *Jb. ulopus* incluyendo además dos especies nuevas en proceso de descripción con base en criterios morfológicos. Estas fueron nombradas en el presente estudio como *Trichoprosopon* sp. n.e A y *Trichoprosopon* sp. n.e B. El análisis molecular indicó la presencia de 3 posibles especies en el complejo *Tr. pallidiventer*, que incluyó las especies *Trichoprosopon* sp. n.e A, *Tr. pallidiventer* s.s. y *Tr. pallidiventer* s.l. Así mismo se observó una clara separación entre los individuos de las especies de los complejos *Tr. pallidiventer* y *Tr. digitatum*. Los especímenes identificados como pertenecientes al género *Johnbelkinia* se ubicaron en 4 agrupaciones, dos de las cuales corresponden a *Jb. ulopus* (Grupo VI en Figura 1) y *Jb. leucopus* (Grupo IV) respectivamente.



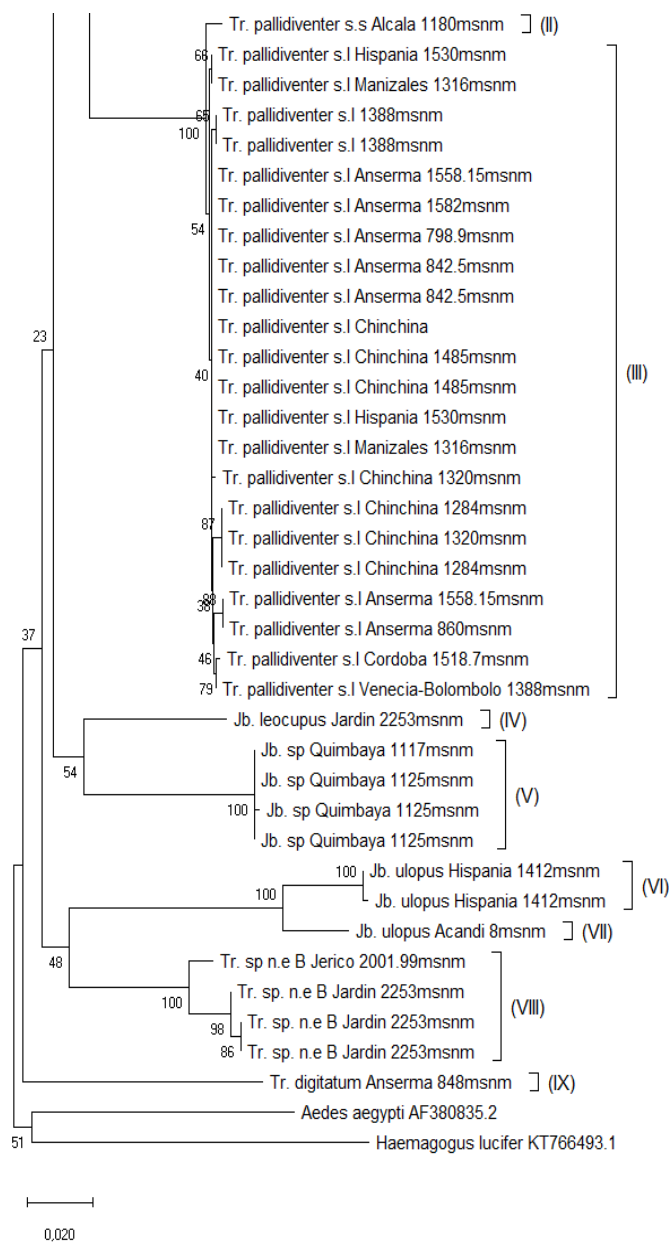


Figura 1. Dendrograma obtenido por NJ

Una tercera agrupación corresponde a 4 larvas identificadas como *Johnbelkinia* sp. (Grupo V), las cuales están más relacionadas con *Jb. leucopus* (Grupo IV) que con cualquier otra especie del género. La cuarta agrupación se identificó por morfología como *Jb. ulopus* (Grupo VII), sin embargo, la distancia genética respecto al grupo VI sugiere que podría tratarse de una nueva especie en este género. La especie *Trichoprosopon* sp. n.e B se encontró más estrechamente relacionada con los especímenes y agrupaciones del género *Johnbelkinia* que con los individuos

del género *Trichoprosopon*. Las agrupaciones de *Jb. leucopus* (Grupo IV) y las 4 larvas identificadas molecularmente como *Johnbelkinia* sp. (Grupo V) están más relacionadas con las especies del complejo *Tr. pallidiventer* (Grupos I, II y III).

El análisis por ML mostró consistencia en 8 de los 9 haplogrupos representados en el dendrograma del análisis de NJ. En el árbol de ML el grupo *Tr. pallidiventer* s.l. es incluido dentro de la agrupación *Tr. pallidiventer* s.l. formando una sola agrupación denominada como grupo II (Figura 2). Además, la secuencia de la especie identificada morfológicamente como *Tr. digitatum* está más relacionada con las secuencias de los grupos externos usados en el análisis (*Ae. aegypti* y *Ha. lucifer*) que con género *Trichoprosopon* o al género *Johnbelkinia*. Lo anterior es inconsistente con el análisis por NJ donde *Tr. digitatum* (Grupo IX) es claramente cercano a los géneros *Johnbelkinia* y *Trichoprosopon*. La introducción de otras especies del género *Trichoprosopon* podría dilucidar y corregir dicha inconsistencia ya que se esperaría una mayor afinidad o cercanía entre las secuencias de otras especies del género y *Tr. digitatum*.

Los análisis de NJ y ML fueron consistentes en la relación de la especie *Trichoprosopon* sp. n.e B con las agrupaciones del género *Johnbelkinia*. Del mismo modo hubo consistencia en el análisis de ML y NJ respecto a las 4 larvas del género *Johnbelkinia* y su relación con *Jb. leucopus*. En este análisis las agrupaciones *Jb. ulopus* (Grupo III y IV de la Figura 2) y *Trichoprosopon* sp. n.e B (Grupo V de la Figura 2) se relacionan más con las secuencias del complejo *Tr. pallidiventer* (Grupo I y II de la Figura 2), lo que es inconsistente con el análisis por NJ donde se encontró mayor cercanía de los grupos IV (*Jb. leucopus*) y V (*Johnbelkinia* sp.).

Un aspecto interesante es que desde la perspectiva molecular no fue clara la diferenciación entre los géneros *Trichoprosopon* y *Johnbelkinia*. Este último género fue parte del género *Trichoprosopon* y posteriormente propuesto como un nuevo género con base en caracteres morfológicos (Zavortink 1979a). Los hallazgos moleculares sugieren una revisión de los criterios y material utilizado por Zavortink (1979a) para la separación e idealmente tener códigos de barras genéticos de dicho material para hacer comparaciones más precisas con base en especies identificadas por morfología por especialistas en el grupo.

Es claro que aún queda un gran trabajo por hacer en la revisión del género *Trichoprosopon* en países como Colombia y en general en su rango de distribución y que desde la perspectiva molecular es deseable la inclusión de individuos de todos los complejos y especies sumándola mayor cantidad de material biológico disponible.

En este contexto, el trabajo conjunto de especialistas y la disponibilidad de material acumulado durante años y de trabajo de campo reciente, ofrecería sin duda, un panorama más completo e información relevante sobre estos mosquitos, razón por la cual este trabajo se considera un importante punto de partida, que vale la pena continuar.

63 Tr. sp. n.e A Jardin 1750msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1934msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1746msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 2403msnm
 Tr. sp. n.e A Salento 2515msnm
 Tr. sp. n.e A Itagui
 63 Tr. sp. n.e A Itagui
 Tr. sp. n.e A Salento 2515msnm
 Tr. sp. n.e A 1320msnm
 Tr. sp. n.e A Anserma 1558.15msnm
 Tr. sp. n.e A Anserma 1558.15msnm
 Tr. sp. n.e A Anserma 1558.15msnm
 Tr. sp. n.e A Anserma 1558.15msnm
 Tr. sp. n.e A Anserma 1558.15msnm
 Tr. sp. n.e A Chinchina 1514.53msnm
 Tr. sp. n.e A Ciudad Bolivar 1827msnm
 Tr. sp. n.e A Ciudad Bolivar 1827msnm
 Tr. sp. n.e A Fredonia 1640msnm
 Tr. sp. n.e A Fredonia 1640msnm
 Tr. sp. n.e A Itagui
 Tr. sp. n.e A Jardin 1702msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1702msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1702msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1702msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1749msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1751msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1751msnm
 45 Tr. sp. n.e A Jardin 1752msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1918msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1918msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1918msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1934msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1934msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1934msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 100 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm(9)
 Tr. sp. n.e A Jardin 2032.6msnm
 Tr. sp. n.e A Jerico 2044msnm
 Tr. sp. n.e A Manizales 1320.72msnm
 Tr. sp. n.e A Salento 2515msnm
 Tr. sp. n.e A Salento 2515msnm
 Tr. sp. n.e A Salento 2515msnm
 Tr. sp. n.e A Jerico 1970msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1934msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm
 Tr. sp. n.e A Salento 2515msnm
 Tr. sp. n.e A Jerico 1969.64msnm
 Tr. sp. n.e A Jardin 1939msnm

(l)

80

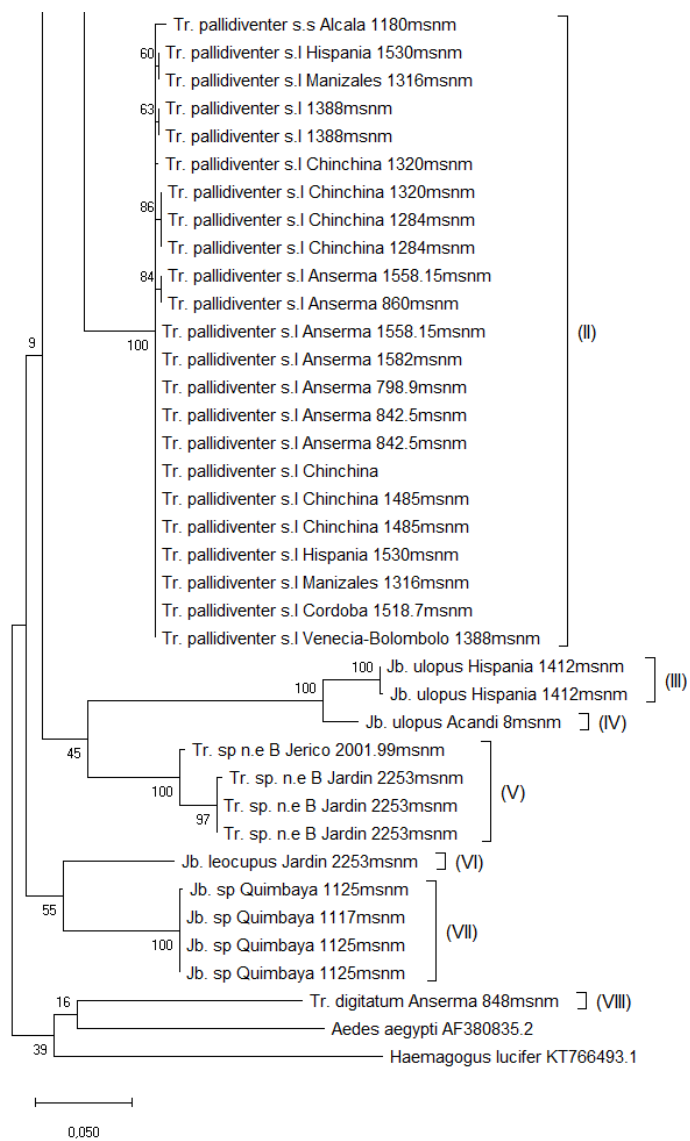


Figura 2. Árbol filogenético obtenido por ML.

REFERENCIAS

Auguste AJ, Adams P, Arrigo NC, Martínez R, Travassos da Rosa APA, Adesiyun A, Chadee DD, Tesh RB, Carrington CVF, Weaver SC. 2010. Isolation and characterization of sylvatic mosquito-borne viruses in Trinidad: enzootic transmission and a new potential vector of Mucambo virus. *Am J Trop Med Hyg* 83:1262–1265.

Clark-Gil S, Darsie F Jr. 1983. The mosquitoes of Guatemala. Their identification, distribution and bionomics, with keys to adult females and larvae in English and Spanish. *Mosq Syst* 15:151–152.

Collins F, Mendez M, Rasmussen M, Mehaffey P, Besansky N, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* Complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;37(1):37–41.

Contreras-Gutiérrez M, Vélez I, Porter C, Uribe SI. 2014. Lista actualizada de flebotómicos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) de la región cafetera colombiana. *Biomédica* 34:483–498.

Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(5):1792–1797. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

Forattini OP. 2002. *Culicidologia médica*. São Paulo, Brazil: Editora da Universidade de São Paulo, 2.

Galindo P, Carpenter SJ, Trapido H. 1951. Ecological observations on forest mosquitoes of an endemic yellow fever area in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 31:98–137

Galindo P, Srihongse S, De Rodaniche E, Grayson MA. 1966. An ecological survey for arboviruses in Almirante, Panama, 1959–1962. *Am J Trop Med Hyg* 15:385–400.

Harbach RE. 1994. The subgenus *Sabethinus* of *Sabethes* (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol* 19:207–234.

Harbach RE, Kitching IJ. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Syst Entomol* 23:327–370

Harbach RE. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*. *Zootaxa* 1668:591–638.

Harbach RE. 2014. Tribe Sabethini Blanchard, 1905. [Internet] Mosquito Taxonomic Inventory [accessed January 22, 2015]. Available from: <http://mosquitotaxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6223>.

Hastrister MW, Lawyer PG, Mauer DJ, Robbins RG, Schultz GW, Srtickman DA. 1998. Disease vector ecology profile. Colombia [Internet] Washington, DC: Armed Forces Pest Management Board [accessed June 10, 2014]. Available from: <http://www.afpmb.org/sites/default/files/pubs/dveps/COLOMBIA.PDF>.

Ivonne Cueto Gómez. 2011. Colonización y frontera agropecuaria en Colombia. De la gesta heroica de modernización, hasta el desarraigo forzado y la disminución de nuestra biodiversidad como producto de nuestra búsqueda del desarrollo

Juan Suaza-Vasco, Andrés López-Rubio, Juan Galeano, Sandra Uribe, Iván Vélez, and Charles Porter "The Sabethines of Northern Andean Coffee-Growing Regions of Colombia," *Journal of the American Mosquito Control Association* 31(2), (1 June 2015). <https://doi.org/10.2987/14-6466R>

Judd D. 1996. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Syst Entomol* 21:129–150.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012; 28(12):1647-1649. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1980; 16(2):111–120. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01731581>.

Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae) *Journal of Medical Entomology*. 2007; 44(1):1–7. [http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[1:DBCDSO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[1:DBCDSO]2.0.CO;2).

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

Lane J, Cerqueira N. 1942. Os Sabetineos da America. *Arq Zool* 3:473–879

Lane J. 1945. Os sabetineos da America. (Addenda e Corrigenda). *Rev Bras Ent* 16:132–157.

Lane J. 1953. Neotropical Culicidae. Vol. II Saõ Paulo, Brazil: University of Saõ Paulo.

Laura Cabezas, Wilson Cabanzo, Fernando Santa, Víctor Alberto Olano, Diana Sarmiento, Sandra Vargas, Juan Felipe Jaramillo, Thor-Axel Stenstrom, Hans J. Overgaard, María Inés Matiz. 2017. Distribución espacial de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en el área rural de dos municipios de Cundinamarca, Colombia.

Nei M. and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Rodaniche E, Galindo P. 1956. Isolation of the virus of Ilhe'us encephalitis from mosquitoes captured in Panama'. *Am J Trop Med Hyg* 10:393–394.

Rodríguez J, Camargo J, Niño J, Pineda A, Arias L, Echeverry M, Miranda C. 2009. Valoración de la biodiversidad en la ecorregión del Eje Cafetero. Pereira, Colombia: CIEBREG

Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Shope RE, Causey OR, Andrade H, Thelie M. 1964. The Venezuelan equine encephalomyelitis complex of group of arthropod-borne viruses, including Mucambo and Pixuna from the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 13:723–727

Uribe SI, Porter CH, Vélez ID. Amplificación y obtención de secuencias de rRNA mitocondrial en *Lutzomyia* spp (Diptera: Psychodidae) vectores de Leishmaniosis. *Revista Colombiana de Entomología*. 1998; 23(3–4):177–185.

Uribe SI, Lehmann T, Rowton ED, Vélez BID, Porter CH. Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2001; 18(1):84–93. <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2000.0863>.

Yuill TM. 1986. The ecology of tropical arthropodborne viruses. *Annu Rev Ecol Syst* 17:189–219.

Zavortink T. 1979a. The new sabethine genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. *Contrib Amer Ent Inst* 17:1–61.

Zavortink T. 1979b. A reclassification of the sabethine genus *Trichoprosopon*. *Mosq Syst* 11:255–257.

Zavortink T. 1981. Species complexes in the genus *Trichoprosopon*. *Mosq Syst* 13:82–85

Zavortink, T.J.; Roberts, D.R. & Hoch, A.L. 1983. *Trichoprosopon digitatum* Morphology, Biology, and potential medical importance. *Mosquito Systematics* 15(2): 141-149p.

Capítulo 3

Subgénero *Kerteszia* del género *Anopheles*

1. Actualización de la información sobre registros de la presencia *Anopheles (Kerteszia)* spp en Colombia

[Artículo próximo a someter]

Actualización de la información sobre registros de la presencia *Anopheles (Kerteszia)* spp en Colombia

Update on records of *Anopheles (Kerteszia)* spp presence in Colombia

JUAN SUAZA-V, CHARLES PORTER, GUILLERMO RÚA, CAROLINA GONZALEZ, SANDRA URIBE

Resumen

Objetivos: actualizar los registros disponibles sobre la presencia de las especies del subgénero en Colombia. Proporcionar información geográfica disponible para las especies y sobre los autores que hacen el registro. Evaluar la disponibilidad de la secuencia código genético de barras (*cox1*) para las especies y registros procedentes de Colombia en bases de datos. *Metodología:* Se revisó la información secundaria disponible y se documentaron los registros. Adicionalmente se revisó material de colectas provenientes de campo que fue depositado en el Museo, MEFLG. *Resultados:* Se encontraron registros de presencia para 8 especies para Colombia: *An. homunculus*, *An. bambusiculus*, *An. phollidotus*, *An. lepidotus*, *An. neivai*, *An. boliviensis*. Además de esta última especie, se registra la ocurrencia de las otras dos especies del complejo boliviensis con base en evidencia molecular. Los registros indican la presencia del subgénero en 16 departamentos. Para 5 especies se encontró información disponible de la región código genético de barras en 83 registros de especímenes de diferentes regiones del país.

Palabras clave: Diptera, mosquitos, *Anopheles*, *Kerteszia*

Abstract

Objectives: To update the records available on the presence of subgenus in Colombia. To provide geographic information available for the species and the authors that make the registration. To evaluate of the availability of the sequence barcode (*cox1*) for the species and records of Colombia. *Methodology:* The secondary information available was reviewed and the records were documented. In addition, material from the field that was deposited in the Museum MEFLG, was reviewed. *Results:* Presence records were found for 8 species for Colombia: *An. homunculus*, *An. bambusiculus*, *An. phollidotus*, *An. lepidotus*, *An. neivai*, *An. boliviensis*. In addition to this last species, the occurrence of the other species of the *boliviensis* complex is recorded based on molecular evidence. Records indicate the presence of the subgenus in 16 departments. For more information, see the barcode genetic code in 83 records from different regions of the country.

Keywords: Diptera, mosquitoes, *Anopheles*, *Kerteszia*

INTRODUCCIÓN

El subgénero *Kerteszia* de *Anopheles*, ha sido extensivamente estudiado, a pesar de lo cual hay aún dificultades taxonómicas y preguntas por resolver en relación con su sistemática bionomía y papel vectorial (González & Carrejo, 2009; Montoya et al., 2011; WRBU, 2019; Ahumada et al., 2016).

En Colombia además del trabajo realizado por González y Carrejo en el 2009, existen relativamente pocas actualizaciones o información consistente y disponible que de cuenta de los trabajos taxonómicos con el subgénero y en general sobre su presencia y distribución en el país, siendo este último un aspecto fundamental para facilitar la planeación y ejecución de planes adecuados de manejo y control (Montoya et al., 2011; Ahumada et al., 2016; Fuller et al., 2016; Escovar et al., 2014).

La mayor cantidad de información disponible se conoce para la especie *An. neivai*, en relación con su papel como vector de malaria (Ahumada et al., 2016; López et al., 2019). Su presencia ha sido registrada en 11 departamentos (González & Carrejo 2009). Ahumada et al. en el 2018 realizó una actualización para las aproximadamente 47 especies de *Anopheles* registradas para Colombia en 8 complejos de especies, en relación con la malaria en 70 localidades del país. En este trabajo como en la mayoría (Olano et al., 2001; Gutiérrez et al., 2008; Montoya et al., 2011; Naranjo et al., 2013) aparecen registros para *An. neivai* considerado como un vector de malaria de importancia local, confirmando la distribución en la costa pacífica; no obstante, se sugiere con base en datos moleculares la presencia de una probable nueva especie del subgénero o del complejo *An. neivai* referida como *An. neivai* 4. No obstante, como lo mencionan los autores, no existen documentos taxonómicos asociados al estatus de esta posible nueva especie.

En cuanto a las otras especies, los registros de presencia y distribución de *An. phollidotus* pueden ser confusos por las similitudes y la asignación errónea de especímenes de esta especie como *An. lepidotus*, e incluso por confusiones con otras especies como *An. boliviensis* (González & Carrejo 2009; Harrison et al., 2012).

En relación con *An. bambusiculus* a pesar de que la localidad tipo es referida en Colombia, es muy poco lo que se conoce de ella (González & Carrejo 2009). Al parecer esta es la única especie del subgénero que ocurre en guadua y se ha sugerido que la distribución es en las vertientes de los Andes y la cuenca del Amazonas. Los registros iniciales se concentran en solo dos departamentos (González & Carrejo 2009).

De forma similar para la especie *An. homunculus* cuya presencia ha sido registrada para el litoral pacífico colombiano, ésta fue descrita originalmente a partir de tres hembras colectadas en Restrepo, Meta pero se conocen confusiones con *An. neivai* e individuos con formas intermedias entre ambas especies por lo cual se ha sugerido revisiones adicionales (González & Carrejo 2009). Esta especie aparece registrada en 7 departamentos (González & Carrejo 2009).

En cuanto a *An. boliviensis* el panorama es más complejo aun dado que de acuerdo con Zavortink (1973), las hembras usadas para su descripción corresponden en realidad a la especie *An. lepidotus*. Esta especie hace parte del complejo llamado *An. boliviensis* que fue reportado y que al parecer se encuentra de forma simpátrica con las otras dos especies en ecosistemas de altura (Navarro et al., 2010). En Colombia hay pocos datos sobre la presencia y distribución del complejo; sin embargo *An. boliviensis* se registra en 8 departamentos (González & Carrejo 2009).

Para especies como *An. bellator* y *An. cruzii* existen dudas sobre su presencia en Colombia. En relación con esta especie la mayoría de los registros no han sido corroborados y se considera que su distribución real se limita a la zona de la costa del este de Brazil (González & Carrejo 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontró registros de presencia del subgénero *Kerteszia* para 17 departamentos de Colombia (Tabla 1). En muchos casos no están completos los datos sobre la ubicación geográfica de la procedencia de las colectas y en la mayoría no aparecen registrados los datos de altura sobre el nivel del mar.

Un total 162 registros fueron encontrados de los cuales 100 corresponden a información secundaria y 62 corresponden a registros relacionados con trabajo de campo y taxonómico del presente trabajo.

El mayor número de registros encontrados corresponden a la especie *An. neivai*, cuya presencia se reconoce en 14 departamentos. Respecto a esta especie es claro que su mayor representatividad corresponde a la costa pacífica colombiana donde su papel como vector secundario de malaria es ampliamente reconocido (Gutiérrez et al., 2008; Astaiza et al., 1988). Existe duda sobre algunos registros de esta especie en algunas localidades principalmente de altura (Porter, González com.per.), en departamentos como Antioquia, por ejemplo, en Yarumal, donde trabajos de campo realizados como forma de verificar estos datos no fueron exitosos.

Para esta especie con un amplio rango de distribución y que ha sido confundida con varias especies del subgénero y para la cual además se sugiere la posible existencia de un complejo de especies, sería deseable un trabajo de revisión de colecciones y registros de presencia, que pudieran, verificarse y complementarse con trabajo de campo en todo su rango de distribución. En

cuanto a su determinación como un complejo de especies a pesar de la variación morfológica (Montoya-Lerma, 2011; Porter com.per.) y molecular (Ahumada et al., 2016), el número de las especies y su distribución siguen siendo aspectos controversiales (López et al., 2019). Las evidencias recientes sugieren que algunas de las variantes moleculares más divergentes bien podrían ser nuevas especies del grupo, pero hay poca claridad sobre el estatus taxonómico de las mismas (Ahumada et al., 2016). Estudios recientes sobre la existencia de un complejo de especies han interpretado la evidencia como no concluyente; no obstante, estudios taxonómicos y biogeográficos en su rango de distribución son necesarios.

En cuanto a las especies *An. lepidotus* y *An. phollidotus*, trabajos como el de (Harrison et al 2012). han permitido clarificar en gran medida la distribución y la importancia vectorial de ambas especies. Al respecto es claro que *An. lepidotus* no es el vector de malaria previamente incriminado. Los datos de presencia e importancia vectorial de *An. lepidotus* de Quiñones et al., (1984) fueron corregidos quedando restringida su distribución a 4 localidades de tres países (incluido Colombia) localizados en la vertiente amazónica de los andes. En Colombia solamente se tiene registros validados en el departamento del Meta. Los registros encontrados antes de Harrison et al., 2012 marcados con asterisco (*) en la Tabla 1, corresponden en realidad a *An. phollidotus*. El rango de distribución de esta última especie se amplió a 5 departamentos: Tolima, Caquetá, Cundinamarca, Antioquia y Magdalena. Los registros para estos dos últimos departamentos corresponden a trabajo de campo del presente estudio en 2 localidades de altura: Belmira y Jardín para el primero y en la Sierra nevada de Santa Marta, para el segundo.

En cuanto a *An. bambusicolus*. Todos los datos corresponden a información secundaria y los registros se restringen a dos departamentos Caquetá y Meta, en 5 localidades. Esta especie ha sido menos estudiada en el país y como se mencionó previamente es la única

An. homunculos aparece con registros de información secundaria en 8 departamentos y 14 localidades. Los datos publicados indican que aún hay vacíos de información en cuanto a su distribución y papel vectorial. De acuerdo con Sallum et al., (2009), esta especie se encuentra en la vertiente oriental de los andes de los andes colombianos y 7 países más. Algunos estudios previos como los de Zavortink (1973) y Sallum (2009) sugieren variación que podría indicar la existencia de un complejo de especies. La variación fue observada en comparaciones de especímenes de Colombia Y Trinidad. Trabajos posteriores con datos moleculares (ITS) incluyendo especímenes colombianos de Chocó (itsmina y Charambirá) y Meta (Restrepo localidad tipo). Además de otros de Brazil y Trinidad evidenciaron variantes compartidas entre Brazil y Colombia, que difieren de Trinidad. Todo lo anterior confirma la pertinencia de trabajos continuados en la mayoría de las especies y en general del sub género.

En relación con *Anopheles* del “grupo *boliviensis*” los registros sumados de revisión secundaria y de trabajo de campo del presente estudio indican la presencia en 7 departamentos. No obstante, los registros para 6 departamentos se encuentran como *An. boliviensis*, lo cual debería

confirmarse debido a que la separación de las tres especies del grupo (*An. boliviensis*, *An. rollai* y *An. gonzalesrinconesi*) no es posible con base en los caracteres morfológicos de hembras adultas. Esto es relevante ya que para *An. boliviensis* no se conocen los estados inmaduros ni el macho. La revisión de los especímenes colombianos determinados como *An. boliviensis* considerando los caracteres de las dos especies publicados por Cova-García y Sutil (1977) y los referidos por Zavortink (1979), en la revisión del subgénero, podían clarificar estos registros.

Uno de los hallazgos más importantes del trabajo de campo en el presente estudio, lo constituye los machos del grupo *boliviensis* encontrados en Jardín Antioquia, cuya genitalia difiere de las ilustraciones en las descripciones de las otras dos especies del grupo, sugiriendo que ésta podría corresponder al macho de *An. boliviensis* lo cual debería verificarse incluyendo, por ejemplo, metodologías moleculares. Este hallazgo, también podría representar una nueva especie para el subgénero.

Otros hallazgos importantes son la presencia del “grupo *boliviensis*” en el departamento de Antioquia en los municipios de Jardín, Belmira y la Estrella.

Los registros de *An. cruzii* en Colombia son realmente dudosos y aunque los caracteres diagnósticos son provistos en González y Carrejo (2009) para facilitar la detección de su probable presencia, de acuerdo con los datos actuales este registro debería verificarse considerando que puede tratarse de una confusión con *An. neivai* o *An. homúnculos* (González & Carrejo, 2009; Sallum et al., 2009).

El registro de secuencias de la llamada región “código genético de barras” para 75 registros, constituye sin duda una oportunidad para estudios de taxonomía y sistemática molecular que podría facilitar el avance en el conocimiento y entendimiento del subgénero, en especial si se considera los avances en grupos similares para mosquitos (Batovska et al., 2016; Ruiz et al., 2012).

Tabla 1. Registros de presencia de especies de *Anopheles (Kerteszia)* spp en Colombia

Información molecular disponible	Especie	Departamento	Localidad	Latitud	Longitud	Referencia	Observaciones
No	<i>Anopheles bambusicolus</i>	Caquetá	El Paujil, San Vicente del Caguán	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles bambusicolus</i>	Meta	Restrepo, Villavicencio	n.d	n.d	González R. & Carrejo 2009	
No	<i>Anopheles bambusicolus</i>	Meta	La Unión	n.d	n.d	Komp, 1937	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Meta	Villavicencio	n.d	n.d	Bates, 1944	Corregido a <i>Anopheles lepidotus</i>
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Caldas	Manizales (MUSENUV)	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Cauca	López de Micay, Santa Rosa	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Chocó	Condoto, Itsmina, Quibdó	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	

No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Cundinamarca	Medina, Pandi, Ospina Pérez	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Huila	Colombia, Neiva, Palermo, Tello	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Meta	Acacís, Restrepo, Villavicencio	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Nariño	El Tampo, Tumaco	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Tolima	Cunday, Dolores, Icononzo, Prado, Villarrica	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles cruzii</i>			n.d	n.d	Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU) (2019) Systematic catalog of Culicidae, http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3425 (Accessed 27 March 2019).	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 37' 59" N	75° 49' 48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 37' 59" N	75° 49' 48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 37' 59" N	75° 49' 48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	La Estrella	06° 08' 7,2" N	75° 40' 25" W	GSM	
	<i>Anopheles grupo boliviensis</i>	Antioquia	Belmira - Páramo Santa Inés	06° 37' 30" N	75° 42' 25" W	GSM	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Meta	Restrepo	n.d	n.d	Komp, 1937	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Boyacá	Cubará, Otanche	n.d	n.d	González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Cauca	Balboa, Timbiquí	n.d	n.d	González R. & Carrejo 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Chocó	Itsmina (MUSENUV), Pizarro	n.d	n.d	González R. & Carrejo, 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Cundinamarca	Ubalá	n.d	n.d	González & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Meta	Restrepo, Villavicencio	n.d	n.d	González R. & Carrejo, 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Norte de Santander	Arboledas, Chinácota, Salazar	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Tolima	Villarrica	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	* <i>Anopheles lepidotus</i>	Caquetá		n.d	n.d	Olano et al., 2002	
No	* <i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca		n.d	n.d	Olano et al., 2002	

No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Magdalena		n.d	n.d	Olano et al., 2002	
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima		n.d	n.d	Olano et al., 2002	
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Caquetá	Florencia - El Diamante	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Magdalena	Santa Marta - Ciudad Perdida	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Choapal	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Los Alpes	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Las Palmeras	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Periquito	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - San Miguel	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Alto de Icononzo	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Dos Quebradas	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Guamitos	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Guatimbol	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - La Fila	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - La Laja	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Naranjal	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Parroquia Vieja	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - San José	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Valencia	n.d	n.d	Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Caquetá	Florencia	n.d	n.d	González R. & Carrejo, 2009	
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina, Paratebueno	n.d	n.d	González R. Carrejo., 2009	
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Norte de Santander	Sardinita	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Magdalena	Santa Marta	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>*Anopheles lepidotus</i>	Meta	Restrepo	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Cunday (MUSENUV), Dolores, Iconozo (MUSENUV), Prado, Purificación (MUSENUV), Villarrica (MUSENUV)	n.d	n.d	González R. & Carrejo 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Valle del Cauca	Cali (MUSENUV)	n.d	n.d	González R. & Carrejo N., 2009	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Acandí	8° 34' 39.81" N	77° 23' 56.31" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Acandí	8° 34' 39.81" N	77° 23' 56.31" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 21' 40.81" N	77° 21' 23.89" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 21' 41.01" N	77° 21' 18.8" W	GSM	

Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Nariño	Santa Bárbara - Iscuandé	02° 37' 38.2" N	78° 4' 54.5" W	Escobar, 2014 (Tesis)	
No	<i>Anopheles neivai</i>	-	Costa Pacífica	n.d.	n.d.	Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Casanare		n.d.	n.d.	Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Cundinamarca		n.d.	n.d.	Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Bolívar		n.d.	n.d.	Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Caquetá		n.d.	n.d.	Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura - La Barra	3° 58' N	77° 23' W	Gutiérrez et al., 2008	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura - Puerto España	4° 2' N	77° 26' W	Gutiérrez et al., 2008	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Charambirá	n.d.	n.d.	Astaiza et al., 1988	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Rio Raposo; pacífico colombiano	n.d.	n.d.	Lee, V. & Sanmartín, C. 1967	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco	n.d.	n.d.	Ahumada et al, 2016	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Antioquia	Amalfi, Urrao, Yarumal	n.d.	n.d.	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Bolívar	Mompós	n.d.	n.d.	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Boyacá	Cubará, Otanche, Támara	n.d.	n.d.	González R. & Carrejo 2009	

No	<i>Anopheles neivai</i>	Cauca	Argelia, Balboa, Guapi, López de Micay, Patía, Timbiquí	n.d	n.d	González R. & Carrejo, 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Condoto, Itsmina (MUSENUV), Nóvita, Nuquí, Pizarro, Quibdó (MUSENUV), San José del Palmar, Sipí, Tadó	n.d	n.d	González R. & Carrejo, 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Cundinamarca	Pandi, Ubalá, Yacopi	n.d	n.d	González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Nariño	Barbacoas, El Charco (MUSENUV), El Tampo, La Tola, Los Andes, Mosquera, Olaya Herrera, Ricaurte, Samaniego, Santa Bárbara, Santa Cruz, Taminango, Tumaco	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Norte de Santander	Arboledas, Cucutilla, Hacari, Salazar, Sardinata, Toledo	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Tolima	Icononzo, Purificación, Villarrica	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura (MUSENUV)	n.d	n.d	González R. & Carrejo., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Vaupés	Mitú	n.d	n.d	González R. & Carrejo, 2009	
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Sierra Nevada de Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Sierra Nevada de Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Cunday	04° 47' 59.1" N	74° 34' 50.21" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Icononzo	04° 51' 02.1" N	74° 09' 003" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Villarrica	03° 52' 03.4" N	74° 39' 09.8" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Purificación	03° 51' 58.11" N	74° 55' 59.83" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Prado	03° 45' 04.15" N	74° 49' 55.9" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Antioquia	Belmira - Páramo Santa Inés	06° 37' 30" N	75° 42' 25" W	GSM	
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	

REFERENCIAS

Ahumada, M., Orjuela, L., Pareja, P., Conde, M., Cabarcas, D., Cubillos, E., Lopez, J., Beier, J., Herrera, S. & Quiñones, M. (2016) Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria Journal*; 15:407.

- Astaiza, R., Murillo, C. & Fajardo, P. (1988) Biología de *Anopheles (Kerteszia) neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. II Fluctuación de la población adulta. *Revista de Saúde Pública*, 22 (2), 101–108. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101988000200005>
- Batovska J, Blacket MJ, Brown K, Lynch SE (2016). Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecol Evol.* Mar 28;6(9):3001-11. doi: 10.1002/ece3.2095. eCollection 2016 May. PubMed PMID:27217948; PubMed Central PMCID: PMC4863023.
- Cova-García P. & Sutil E. (1977). *Claves gráficas para la clasificación de anofelinos de Venezuela*. Publ. Div. End. Rurales, Dir. Malariol. Sam. Amb. MSAS. Maracay, Venezuela. 65 p.
- Escovar, J., González, R., Quiñones, M., Wilkerson, R., Ruiz, F. & Harrison, B. (2014) Morphology of the larvae, male genitalia and DNA sequences of *Anopheles (Kerteszia) pholidotus* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 109(4): 473-479.
- Fuller, Douglas & Alimi, Temitope & Herrera, Sócrates & Beier, John & Quiñones, Martha. (2016). Spatial Association between Malaria Vector Species Richness and Malaria in Colombia. *Acta Tropica*. 158. 10.1016/j.actatropica.2016.03.008.
- González R, Carrejo N. (2009). Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución, Segunda edición, Programa editorial Universidad del Valle, Cali, Colombia, 260 pp.
- Gutiérrez LA, Naranjo N, Jaramillo LM, Muskus C, Luckhart S, Conn JE, et al. (2008) Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Trop*; 107:99-105.
- Harrison, B., Ruiz, F., Calderon, G., Savage, H., Pecor, J. & Wilkerson, R. (2012). *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*. 3218. 1-17. 10.11646/zootaxa.3218.1.1.
- López-Rubio A, Suaza-Vasco JD, Solari S, Gutiérrez-Builes L, Porter C, Uribe SI. (2019) Intraspecific phylogeny of *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab 1913, based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Infect Genet Evol.*
- Montoya, J., Solarte, Y., Giraldo, G., Quiñones, M., Ruiz, F., Wilkerson, C. & González, R. (2011) Malaria vector species in Colombia - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 106(Suppl. I): 223-238.

- Naranjo-Díaz N, Rosero D, Rúa-Uribe G, Luckhart S, Correa M. Abundance, behavior and entomological inoculation rates of anthropophilic anophelines from a primary Colombian malaria endemic area. *Parasit Vectors*. 2013;6:61. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-61>
- Navarro J, Del Ventura F, Zorrilla A, Liria J (2010). Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Rev Biol Trop*; 58:245-54.
- Olano VA, Brochero HL, Saenz R, Quiñones ML, Molina J 2001. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomedica 21*: 402-408.
- Quiñones, M., Suarez, M., Rodriguez, A., Fleming, G. & Galvis, L. (1984) Comportamiento de *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* Zavortink, 1973, y su incriminación como posible vector de malaria en el departamento del Tolima, Colombia. *Biomédica* Vol. 4, No 1.
- Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon SN, Levin DM, Quiñones ML, Póvoa MM, Linton YMM (2012). DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors*; 5(1):44.
- Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU) (2019) Systematic catalog of Culicidae, http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3425 Accessed 27 March 2019).

2. *Anopheles (Kerteszia)* (Diptera: Culicidae) desde la perspectiva de la secuencia código de barras de ADN

[Artículo próximo a someter]

Material suplementario III:

Actualización de la información sobre registros de la presencia de *Anopheles (Kerteszia)* spp en Colombia

Anopheles (Kerteszia) (Diptera: Culicidae) desde la perspectiva de la secuencia código de barras DE ADN

New Insights into *Anopheles (Kerteszia) (Diptera: Culicidae) species using DNA barcode*

JUAN SUAZA-V, CAROLINA GONZÁLEZ-M, JOHAN ACEBEDO-V,
SANDRA URIBE

Resumen

El subgénero *Kerteszia* del género *Anopheles* (Diptera: Culicidae) incluye especies de importancia médica, algunas de las cuales han sido incriminadas como vectores de malaria. La taxonomía del grupo es compleja con especies morfológicamente similares o que hacen parte de complejos de especies. En el presente trabajo se evaluó la utilidad de la secuencia código de barras genético para separar las especies del subgénero. El análisis realizado con base en 76 secuencias indicó 12 MOTUS de los cuales 7 correspondieron con las especies asignadas previamente por morfología según el registro de las bases de datos. En el análisis de distancia por NJ, algunas secuencias asignadas como *An. neivai* no se incluyeron en el MOTU conformado por mayoría de las secuencias de esta especie, que ha sido previamente sugerida como un complejo de especies. Adicionalmente un MOTU que incluyó dos especímenes sin identidad asignada por morfología, se encontró relacionado con *An. phollidotus* desde el análisis molecular. Para el caso de *An. boliviensis* se observaron 3 MOTUS que podrían representar las 3 especies de *An. grupo boliviensis* previamente descritas en el complejo. De acuerdo con el análisis de barcoding gap las diferencias intraespecíficas estuvieron en el rango de 0-0,027 y las interespecíficas entre 0,036 y 0,108. En el caso del “grupo boliviensis”, las distancias entre los 3 MOTUS podrían estar sugiriendo las 3 especies, con un rango de variabilidad interespecie entre 0,025-0,096.

Palabras Clave: *Anopheles*, código de barras de ADN, taxonomía y sistemática

Abstract

The subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae) include species of medical importance, some of which have been incriminated as vectors of malaria. The use of traditional taxonomy in this group is recognized as a difficult task due to the presence of closely related and superficially similar species and species complex. In this work was assessed the effectiveness of DNA barcoding for identifying species in the subgenus. The analysis included 76 DNA barcode

sequences and revealed 12 MOTUS, of which 7 agreed on the morphology-based taxonomic assignments. Some sequences established previously as *An. neivai* were not included in MOTU of these species obtained by Neighbor-Joining analysis. This specie has been considered as species complex. Also, it was recognized a MOTU which seems to be related to *An. phollidotus*, but further analysis is required to conclude whether the specimens belong to this specie or not. On the other hand, 3 MOTUS were identified as *An. boliviensis* and they could represent the 3 species of *An. boliviensis* group previously described as part of the complex. According to the barcoding gap, the intraspecific and interspecific means are in the range of 0-0,027 and 0,036-0,108, respectively. Finally, for “boliviensis group”, the genetic distances of the 3 MOTUS were in a range of 0,025-0,096, probably indicating the presence of 3 species.

Keywords: *Anopheles*, DNA barcode, taxonomy and systematics

INTRODUCCIÓN

El subgénero *Kerteszia* del género *Anopheles* (Diptera: Culicidae) está compuesto por 12 especies (Harbach, 2019). Estas especies desarrollan sus primeras etapas y estados inmaduros casi de forma exclusiva en el agua que se acumula en hojas de bromelias terrestres y epífitas presentes en bosques de regiones Neotropicales (Zavortink, 1973; Del Ventura *et al.*, 2013) con excepción de *An. bambusicolus*, que usualmente se encuentra en los bambúes (Zavortink, 1973).

El rango geográfico de distribución del subgénero se extiende desde México hasta el sur de Brasil, incluyendo islas del Caribe como Trinidad y Tobago, y las áreas costeras del Pacífico y el Atlántico (Escobar *et al.*, 2014) no obstante está ausente en Chile y Uruguay (Collucci y Sallum, 2003). La distribución altitudinal del subgénero difiere entre sus especies, la mayoría de ellas se encuentra en las partes altas de las cordilleras y bosques nublados, sin embargo, para *An. neivai* y *An. bellator*, la mayoría de los registros son de zonas bajas (Del Ventura *et al.*, 2013; Rosero *et al.*, 2017; Ahumada *et al.*, 2016).

Para Colombia, el interés particular por identificar las especies del subgénero se relaciona con que algunas de sus especies, como *An. neivai*, *An. pholidotus* y *An. boliviensis*, han sido incriminadas como vectores de malaria. Algunas de ellas como *An. neivai* poseen importancia como vectores involucradas en regiones costeras con gran número de casos registrados como la costa Pacífica (Escobar, 2014; Escobar *et al.*, 2014; Montoya *et al.*, 2011; Harrison *et al.*, 2012). En total para la fecha se encuentran reportadas 7 especies del subgénero en Colombia (Escobar *et al.*, 2014, Ahumada *et al.*, 2016). Sin embargo, la identificación de estas especies en los focos de transmisión ha sido difícil por su similaridad morfológica y por la ausencia de claves taxonómicas completas y adecuadas que permitan diferenciarlas (Harrison *et al.*, 2012; Brochero y Quiñones, 2008). Esto ha generado incluso confusiones respecto a su rol como vectores de malaria (Escobar, 2014; Harrison *et al.*, 2012). En este contexto, y de forma reciente se considera útil estudiar la

variabilidad a nivel molecular de secuencias de ADN en fragmentos mitocondriales y evaluarla para la separación especies y la asignación de individuos con identidad desconocida a grupos que representan especies previamente definidas por morfología (López *et al.*, 2016; Rosero *et al.*, 2017). Tal es el caso de la región *cox1* (Citocromo c Oxidasa Subunidad 1) conocida como código de barras genético, la cual fue descrita por Hebert *et al.* (2003, 2004) para la separación de especies animales y que ha sido evaluada con éxito para algunos complejos de especies de mosquitos (Ahumada *et al.*, 2016; Escovar *et al.*, 2014).

En el presente estudio se consideró dicha región como un complemento que podría ser de utilidad para diferenciar las especies de *Anopheles* del grupo *Kerteszia*. De esta forma, se evaluó la disponibilidad en bases de datos de secuencias pertenecientes a especímenes del subgénero y se analizó la variabilidad entre ellas y su correlación con la asignación morfológica previa realizada por los autores que las reportan. Algunas de las secuencias incluidas fueron obtenidas por los autores del presente estudio para especies que se consideran parte de dos complejos de especies en el subgénero (*An.* grupo *boliviensis* y *An. neivai*).

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Construcción de librería de secuencias de ADN *cox1* provenientes de bases de datos públicas

Con la finalidad de conocer las secuencias *cox1* disponibles para el subgénero *Kerteszia*, se realizaron búsquedas en las bases de datos “National Center for Biotechnology Information (NCBI)” y “Barcode Of Life Data System (BOLD)” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> y <http://www.boldsystems.org> respectivamente). El sistema de búsqueda consistió en explorar los registros disponibles para cada una de las especies correspondientes al subgénero en ambas bases de datos y con la finalidad de evitar redundancias, se cruzaron los registros ingresados en ambas plataformas por medio de sus respectivos códigos *voucher*. Posteriormente, se elaboró una librería digital de las secuencias disponibles para cada especie, incluyendo los registros de los diferentes países y reseñando adicionalmente aquellas registradas, pero no públicas (en la base de datos BOLD).

b) Secuencias obtenidas por los autores

Se incluyeron en el análisis secuencias obtenidas en el Grupo de Investigación en Sistemática Molecular - GSM, Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, por los autores y que correspondían a especímenes de *An.* grupo *boliviensis*, *Anopheles* sp., y *An. neivai*, provenientes de 3 regiones del país: Jardín (Antioquia), Belmira (Antioquia) y Litoral de San Juan (Chocó). La identificación morfológica de los especímenes fue verificada por el especialista Charles Porter.

c) Análisis de secuencias

Las secuencias fueron alineadas en el programa MEGA 7 utilizando el algoritmo *muscle*. Las variaciones intra e interespecíficas fueron estimadas a partir de las distancias genéticas (*Barcoding gap*) utilizando el modelo de Kimura 2 Parámetros (K2P) (Kimura, 1980) disponible en MEGA 7. El histograma de *Barcoding gap* se realizó utilizando una rutina elaborada en Python. También, se elaboró un dendrograma de distancias *Neighbor-Joining* (NJ) para visualizar de forma gráfica las agrupaciones con base en los haplotipos; para ello se utilizó el modelo K2P con 10000 repeticiones de bootstrap. De la misma forma se realizó un análisis de *Maximum Likelihood* (ML) en el mismo programa con el modelo sugerido por model test, GTR+G+I, con un parámetro G de 5 y 10000 repeticiones de bootstrap.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número total de secuencias registradas en las bases de datos para el subgénero *Kerteszia* fue 401 de las cuales 194 se encontraron en NCBI y 207 en BOLD; de estas últimas, solo 82 corresponden secuencias públicas (Tabla 1 - 2). En BOLD existen registros de todas las especies del subgénero con excepción de *An. gonzalezrinconesi*. Sin embargo, para *An. auyantepuiensis*, *An. bambusicolus* y *An. rollai*, los registros de la plataforma BOLD no son públicos. En la plataforma de NCBI, no se encontraron registros para *An. auyantepuiensis*, *An. bambusicolus*, *An. boliviensis*, *An. gonzalezrinconesi*, y *An. rollai*.

Tabla 1. Secuencias registradas en BOLD para *Anopheles* (*Kerteszia*).

Especies	BOLD			
	Número de especímenes registrados	Número de especímenes con secuencias barcode	Países	Número de secuencias públicas con <i>cox1</i>
<i>An. auyantepuiensis</i>	1	0	NI	0
<i>An. bambusicolus</i>	7	3	Ecuador (7)	0
<i>An. bellator</i>	9	4	Trinidad y Tobago (3)	1
<i>An. boliviensis</i>	2	2	NI	0
<i>An. cruzii</i>	100	41	Brasil (24)	29
<i>An. gonzalezrinconesi</i>	0	-	-	-
<i>An. homunculus</i>	24	14	Brasil (10)	14
<i>An. laneanus</i>	7	6	Brasil (4)	2

<i>An. lepidotus</i>	9	4	Ecuador (7)	6
<i>An. neivai</i>	142	114	Colombia (33), Venezuela (3), México (1), Panamá (4), Ecuador (1)	28
<i>An. pholidotus</i>	20	11	Colombia (8), Venezuela (8)	2
<i>An. rollai</i>	10	8	Venezuela (10)	0

Tabla 2. Secuencias registradas en NCBI para *Anopheles Kerteszia*.

NCBI		
Especies	Número de secuencias de <i>cox1</i>	Países
<i>An. auyantepuiensis</i>	-	-
<i>An. bambusiculus</i>	-	-
<i>An. bellator</i>	1	Brasil
<i>An. boliviensis</i>	-	-
<i>An. cruzii</i>	69	Brasil
<i>An. gonzalezrinconesi</i>	-	-
<i>An. homunculus</i>	19	Brasil
<i>An. laneanus</i>	2	Brasil
<i>An. lepidotus</i>	6	Ecuador
<i>An. neivai</i>	94	Colombia, Guayana Francesa
<i>An. pholidotus</i>	3	Colombia
<i>An. rollai</i>	-	-

Para los análisis de distancias NJ (Figura 1) se utilizaron 76 secuencias (47 de la base de datos y 29 de los autores). No se utilizaron todas las secuencias disponibles debido a que algunas tenían una longitud muy corta.

La longitud de las secuencias alineadas fue de 576pb. La procedencia de las secuencias en relación con los autores y la localidad geográfica de origen aparecen en la Tabla 3.

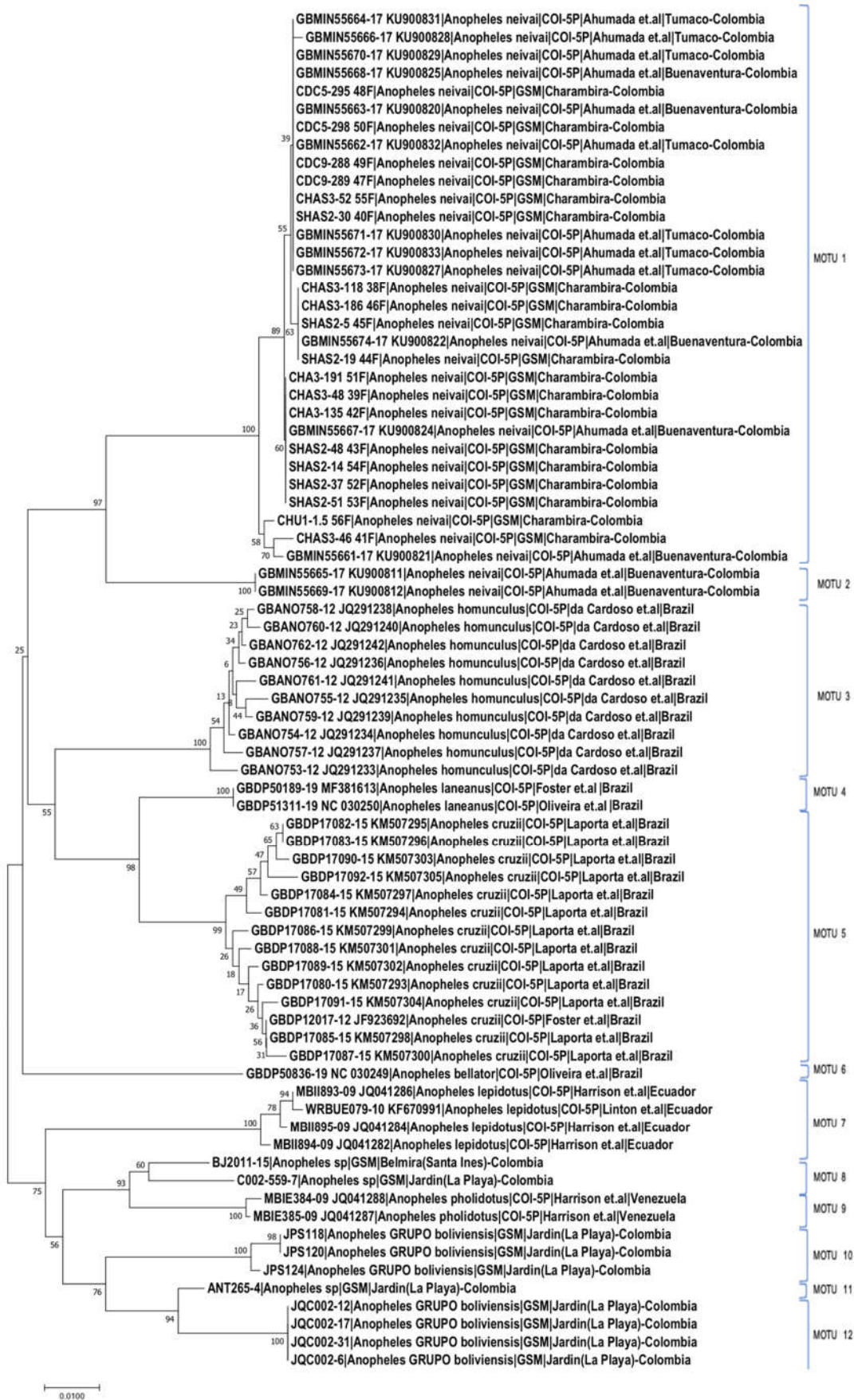


Figura 1. Dendrograma de NJ

Tabla 3. Secuencias utilizadas para el análisis.

Especie	Número de secuencias	Autores	País	Código	Localidad
<i>An. sp</i>	3	GSM	Colombia	ANT265-4	Jardín, La Playa
				BJ2011-15	Belmira, Santa Inés
				C002-559-7	Jardín, La Playa
<i>An. homunculus</i>	10	(1)	Brasil	JQ291233	Bahia state, Camacan,
				JQ291234	Reserva Serra Bonita
				JQ291235	Espirito Santo state, Santa Teresa municipality
				JQ291236, JQ291237, JQ291238, JQ291239	Rio Grande do Sul state, Maquine municipality
				JQ291240, JQ291241, JQ291242	Estado Sao Paulo, Municipio Cananea
<i>An. cruzii</i>	14	(2)	Brasil	JF923692	Sao Paulo state, Cananea municipality
		(3)	Brasil	KM507293, KM507294, KM507295, KM507296, KM507297, KM507298, KM507299, KM507300, KM507301, KM507302, KM507303, KM507304, KM507305	Municipio Tapirai, Estado de Sao Paulo
<i>An. laneanus</i>	2	(4)	Brasil	MF381613	-
		(5)	Brasil	NC_030250	-
<i>An. bellator</i>	1	(5)	Brasil	NC_030249	-
<i>An. neivai</i>	31	GSM	Colombia	CHAS3-52_55F, CHAS3-46_41F, CHAS3-118_38F, CDC9-289_47F, CDC9-288_49F, CHA3-191_51F, CHAS3-48_39F, CHAS3-186_46F, CHU1-1.5_56F, SHAS2-51_53F, SHAS2-48_43F, SHAS2-5_45F, SHAS2-14_54F, SHAS2-37_52F, CHA3-135_42F, CDC5-298_50F, CDC5-295_48F, SHAS2-30_40F, SHAS2-19_44F	Litoral de San Juan, Charambirá
				(6)	Colombia
				KU900827, KU900828, KU900829, KU900830,	Tumaco

KU900831, KU900832, KU900833					
<i>An. pholidotus</i>	2	(7)	Venezuela	JQ041288, JQ041287	Tachira, cerca a Mata Mulas
<i>An. grupo boliviensis</i>	7	GSM	Colombia	JPS118, JPS120, JPS124, JQC002, JQC002, JQC002, JQC002	Jardín, La Playa
<i>An. lepidotus</i>	4	(7)	Ecuador	JQ041286, JQ041282, JQ041284	Napo, Tiputini Biodiversity Station
		(8)	Ecuador	KF670991	Orellana, Yasuni National Park

(1) da Cardoso, J.C., Bergo, E.S., Oliveira, T.M., Sant'ana, D.C., Motoki, M.T. y Sallum, M.A.
(2) Foster, P.G., Bergo, E.S., Bourke, B.P., Oliveira, T.M., Nagaki, S.S., Sant'ana, D.C. y Sallum, M.A.
(3) Laporta, G.Z., Burattini, M.N., Levy, D., Fukuya, L.A., de Oliveira, T.M., Maselli, L.M., Conn, J.E., Massad, E. Bydlowski, S.P. y Sallum, M.A.
(4) Foster, P.G., de Oliveira, T.M.P., Bergo, E.S., Conn, J.E., Sant'Ana, D.C., Nagaki, S.S., Nihei, S., Lamas, C.E., Gonzalez, C., Moreira, C. y Sallum, M.A.M.
(5) Oliveira, T.M., Foster, P.G., Bergo, E.S., Nagaki, S.S., Sanabani, S.S., Marinotti, O., Marinotti, P.N. y Sallum, M.A.
(6) Ahumada, M.L., Orjuela, L.I., Pareja, P.X., Conde, M., Cabarcas, D.M., Cubillos, E.F., Lopez, J.A., Beier, J.C., Herrera, S. y Quinones, M.L.
(7) Harrison, B.A., Ruiz Lopez, F., Calderon Falero, G., Savage, H.M. y Wilkerson, R.C.
(8) Linton, Y.-M., Pecor, J.E., Porter, C.H., Mitchell, L.B., Garzon-Moreno, A., Foley, D.H., Pecor, D.B. y Wilkerson, R.C.

Para los análisis de ML (Figura 2) se utilizaron 76 secuencias (47 de la base de datos y 29 de los autores). No se utilizaron todas las secuencias disponibles debido a que algunas tenían una longitud muy corta. En este análisis se presentaron agrupaciones similares a las obtenidas por NJ.

En el NJ aparecen 12 agrupaciones o MOTUS: *An. neivai1*, *An. neivai2*., *An. homunculus*, *An. laneanus*, *An. cruzii*, *An. bellator*, *An. lepidotus*, *An. sp.*, *An. phollidotus*, *An. grupo boliviensis1*, *An. grupo boliviensis2* y *An. grupo boliviensis3*, de estos 7 incluyen secuencias procedentes de especímenes reportados con origen colombiano.

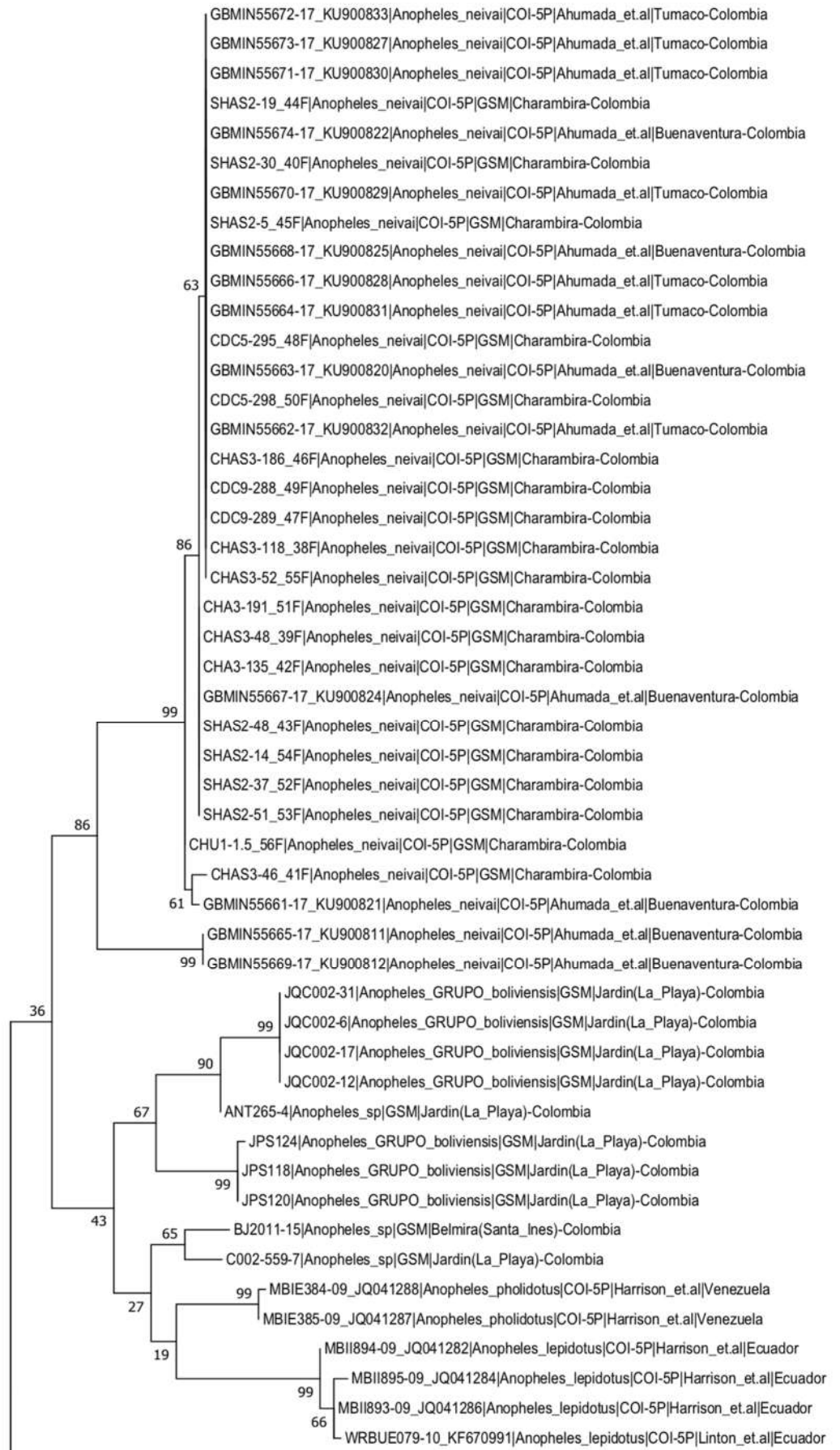
De los 12 MOTUS hay correspondencia entre el trabajo taxonómico por morfología y por molecular para 7, es decir, todos los especímenes nombrados por los autores previamente como una misma especie estuvieron agrupados. En el caso del MOTU referido como *An. neivai2*, que incluyó 2 individuos de Buenaventura, éste estuvo separado del MOTU *An. neivai1*, en el cuál se agruparon las secuencias de la mayoría de individuos de la especie procedentes de Tumaco, Buenaventura y Litoral de San Juan (Colombia). Las secuencias agrupadas en *An. neivai2* fueron reportadas por Ahumada *et al.* (2016), quienes sugirieron con base en la diferenciación encontrada respecto a otros *An. neivai* de su estudio, que los individuos probablemente corresponderían a otra especie del subgénero presente en la región. Sin embargo, mencionaron que se no disponía de datos adicionales que permitieran clarificar el estatus taxonómico de las especies encontradas (*An. neivai* y *An. neivai2*). *An. neivai2* aparece de nuevo al comparar todas las secuencias disponibles

en las bases de datos, que en este caso representan varias localidades del pacífico colombiano. Los resultados del análisis realizado en el presente estudio, confirman que estos dos individuos podrían representar una especie diferente de *An. neivai* y de las demás del subgénero, por lo cual valdría la pena revisarlos desde la perspectiva morfológica y de procedencia geográfica.

Muchas de las especies del subgénero *Kerteszia* son morfológicamente similares, siendo algunas de ellas conocidas únicamente en su estado adulto y otras que se considera están aún por describir. En el NJ, los especímenes *An. neivai*2 se encuentran relacionados con *An. homunculus* y *An. neivai*1. Esta última especie ha sido reconocida como un vector importante de malaria a lo largo de la costa pacífica de Colombia. Los estados inmaduros han sido encontrados abundantemente en bromelias asociadas a manglares adyacentes a los bosques tropicales bajos del occidente del país, y actualmente se reconoce que esta especie posee un amplio rango de distribución desde Ecuador hasta el sur de México. En Colombia, se ha registrado incluso en zonas de alta montaña en altitudes de hasta 2300 metros (SEM, 2009). Sin embargo, la extensión de su distribución, especialmente en zonas de altura, permanece incierta. González y Carrejo (2009) mencionan que algunos de los especímenes de la región pacífica de la costa colombiana poseen caracteres morfológicos que sugieren una forma intermedia entre *An. neivai* y *An. homunculus* lo cual podría estar reflejando en el análisis molecular con lo llamado *An. neivai*2. Según estos autores, las diferencias morfológicas encontradas en los especímenes revisados sugieren que dos o más especies hermanas podrían estar representadas por dichas morfoespecies.

Los registros de distribución de las especies *An. boliviensis*, *An. homunculus* y *An. lepidotus* en Colombia son también confusos, describiendo un amplio rango desde la vertiente occidental de la cordillera occidental hasta la vertiente oriental de la cordillera oriental andina (Ahumada *et al.*, 2016, Escovar *et al.*, 2014). Este patrón de distribución debería ser reevaluado debido a que las tres cordilleras presentan barreras geográficas muy significativas como los valles interandinos y las zonas de alta montaña. De las especies *An. homunculus* y *An. lepidotus* de Colombia, no se encontraron secuencias del código de barras genético disponibles en las bases de datos correspondiendo las secuencias incluidas en los análisis a individuos de Brasil y Ecuador respectivamente.

Los registros para la especie *An. lepidotus* en Colombia son confusos (Quiñones, *et al.* 1984) y se considera que muchos de estos podrían corresponder en realidad a *An. pholidotus* (Harrison *et al.* 2012). Adicionalmente Zavortink (1973) menciona que ésta, es una especie rara, poco común y que no se conocen muchos estudios sobre su taxonomía y distribución.



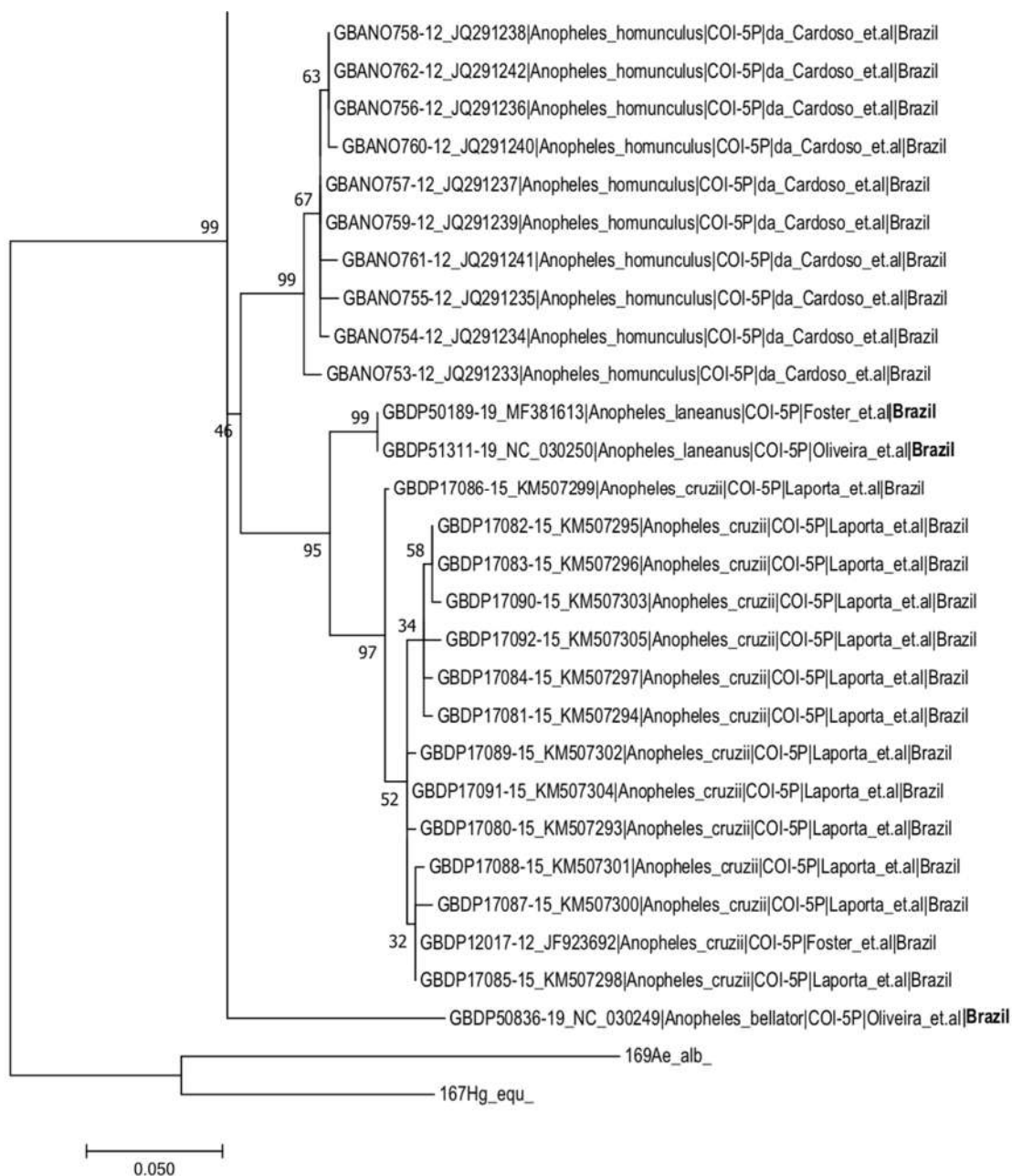


Figura 2. Análisis filogenético por el método de ML.

En cuanto a *An. homunculus*, la especie fue descrita a partir de especímenes colectados en Restrepo-Meta (Colombia) y los registros indican que habita regiones bajas en bosques tropicales húmedos con vegetación densa (Aragão, 1964). No obstante, su distribución geográfica no es totalmente conocida. Estos datos sugieren que estudios sobre su taxonomía y distribución se encuentran lejos de estar completos y que sería deseable incluir caracteres moleculares que podrían ser de gran utilidad.

En cuanto a las secuencias correspondientes a los especímenes que conforman el MOTU 8, *An. sp.*, después de revisarse uno de los especímenes al cuál se tuvo acceso, de nuevo no pudo confirmarse su identidad taxonómica de acuerdo con la clave disponible de Harrison *et al.* (2012). En el análisis molecular éste y otro espécimen sin identidad a nivel de especie aparecen cercanos a *An. pholidotus*, no obstante, la presencia de una fila de escamas claras en el mesanepímero y de escamas oscuras decumbentes entre el segmento 2 y 5 del abdomen (vista dorsal) del espécimen revisado, evidencian que este MOTU está más relacionado con *An.* grupo *boliviensis*. Estos especímenes provienen de ecosistemas de altura en los municipios de Jardín y Belmira (Antioquia), para los cuales en ausencia de machos se dificultó su identificación.

El análisis molecular evidenció la presencia de 3 MOTUS de *An.* grupo *boliviensis*, que podrían estar representando las 3 especies previamente descritas en el complejo, ya que los caracteres morfológicos (hembras adultas) indicaron que los individuos pertenecían a dicho grupo. La presencia de estos individuos en el municipio de Jardín (Antioquia, Colombia) podría constituir un caso similar al reportado por Navarro *et al.* (2010) en el Parque Nacional Dinira en Venezuela (Prado, 2003) donde se encontraron las 3 especies en simpatría a 2232 m.s.n.m.

Un análisis en la plataforma de BOLD con secuencias no públicas sugiere que el MOTU 10 corresponde a *An. rollai* y el MOTU 11 a *An. boliviensis*, aspectos que valdría la pena verificar. De acuerdo con esto, el MOTU 12 podría representar la especie *An. gonzalezrinconensi*. De confirmarse, esta información sustentaría la presencia de las 3 especies del complejo en ecosistemas de altura del municipio de Jardín, Antioquia previamente descritas como grupo 1, 2 y 3 (Suaza-Vasco *et al.*, 2013).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, la secuencia código genético de barras podría constituir una herramienta valiosa para avanzar en el estudio y conocimiento del grupo *Anopheles Kerteszia* en particular si se considera los MOTUS en relación con otras características biológicas y ecológicas de las especies. En el caso de los mosquitos la disponibilidad y efectividad de las secuencias para separar complejos de especies ha sido ampliamente demostrada (Navarro *et al.* 2010) sin embargo, en el caso particular de este subgénero la obtención y publicación de las mismas es reciente lo cual no permite disponer de la información completa, muestra de ello es el acceso solo al 39% de las secuencias disponibles para el grupo en las bases de datos y en particular en BOLD.

Un trabajo conjunto de especialistas permitiría sin duda en un futuro cercano esclarecer muchas de las preguntas que aún permanecen respecto a la sistemática y taxonomía del grupo.

REFERENCIAS

- Ahumada, M., Orjuela, L., Pareja, P., Conde, M., Cabarcas, D., Cubillos, E., Lopez, J., Beier, J., Herrera, S. & Quiñones, M. (2016) Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria Journal*; 15:407.
- Aragão, M. (1964). Distribuição geográfica e abundância das espécies de *Anopheles* (*Kerteszia*) (Diptera, Culicidae). *Rev Bras Malariol Doen Trop* 16: 73-109.
- Astaiza, R., Murillo, C. & Fajardo, P. (1988) Biología de *Anopheles* (*Kerteszia*) *neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. II Fluctuación de la población adulta. *Revista de Saúde Pública*, 22 (2), 101–108.
- Brochero, H. & Quiñones M. (2008). Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. *Biomedica* 28: 18-24.
- Collucci, E. & Sallum, M. A. M. (2003) Phylogenetic analysis of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. *Insect Syst. Evol.* 34: 361-372. ISSN 1399-560X.
- Del Ventura, F., Liria, J. & Navarro, J.C. (2013) Determinación de áreas de endemismo en mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela, mediante criterios explícitos de optimización. *Boletín de malariología y salud ambiental*, Vol. LIII (2); 165-182.
- Escobar, J. (2014) Papel en la transmisión de malaria de las especies de *Kerteszia* en dos zonas endémicas de malaria en Colombia. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Facultad de Medicina.
- Escovar, J., González, R., Quiñones, M., Wilkerson, R., Ruiz, F. & Harrison, B. (2014) Morphology of the larvae, male genitalia and DNA sequences of *Anopheles* (*Kerteszia*) *pholidotus* (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 109(4): 473-479.
- González R, Carrejo N. (2009). Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución, Segunda edición, Programa editorial Universidad del Valle, Cali, Colombia, 260 pp.
- Harbach, R. (2019). *Kerteszia* Mosquito Taxonomic Inventory. Disponible en línea: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list> (consultado en marzo 20 de 2019).

Harrison, B., Ruiz, F., Calderon, G., Savage, H., Pecor, J. & Wilkerson, R. (2012). *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*. 3218. 1-17. 10.11646/zootaxa.3218.1.1.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*; 16(2):111–120.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2015). MEGA 7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0.

López, A., Suaza, J., Marcet, P., Ruíz, N., Cáceres, L., Porter, C. & Uribe, S. (2016) Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia. *Zootaxa* 4175 (4): 377–389

Montoya, J., Solarte, Y., Giraldo, G., Quiñones, M., Ruiz, F., Wilkerson, C. & González, R. (2011) Malaria vector species in Colombia - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 106(Suppl. I): 223-238.

Navarro, J., Del Ventura, F., Zorrilla, A. & Liria, J. (2010). Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* Vol. 58 (1): 245-254.

Prado, M. (2003). Caracterización morfológica y molecular de tres especies del subgénero *Kerteszia* de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) en la región andina venezolana. Trabajo Especial de Grado, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Quiñones, M., Suarez, M., Rodriguez, A., Fleming, G. & Galvis, L. (1984) Comportamiento de *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* Zavortink, 1973, y su incriminación como posible vector de malaria en el departamento del Tolima, Colombia. *Biomédica* Vol. 4, No 1.

Rosero, D., Bickersmith, S., Suaza, J., Porter, C., Correa, M., Conn, J. & Uribe, S. (2017). Molecular operational taxonomic units of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in high Andean mountain ecosystems of Antioquia, Colombia. *Zootaxa* 4277 (3): 369–385

Rosero, D., Suaza, J.D., Barajas, J. & Uribe, S. (2017). Mosquito fauna (Diptera: Culicidae) of high Andean mountain ecosystems in Colombia. *International Journal of Mosquito Research*; 4(6): 10-24

SEM. (2009). Servicio de Erradicación de la Malaria. Ministerio de Salud Pública - República de Colombia. Plan de erradicación de la Malaria en Colombia. Vol. II. Ministerio. de Salud. Pública. Bogotá, 635 pp.

Suaza-Vasco, J., Ruiz-Molina, N., Uribe, S., & Porter, C. (2013). Contribución al conocimiento de *Anopheles* (*Kerteszia*) grupo “boliviensis”(Diptera: Culicidae) en Colombia: Taxonomía y variabilidad genética. *Entomotropica*, 28(2), 160.

Zavortink, T. (1973) Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXIX, A Review of the Subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*.

3. *Anopheles (Kerteszia) boliviensis* en un bosque altoandino del municipio de Jardín (Antioquia-Colombia): Registro y análisis con base en secuencias de ADN mitocondrial

[Artículo próximo a someter]

***Anopheles (Kerteszia) boliviensis* en un bosque altoandino del municipio de Jardín (Antioquia- Colombia): Registro y análisis con base en secuencias de ADN mitocondrial.**

***Anopheles (Kerteszia) boliviensis* in a high Andean forest from the municipality of Jardín (Antioquia-Colombia): Record and analysis based on mitochondrial DNA sequences**

JUAN SUAZA-V, NATALIA RUIZ-M, ANDRÉS LÓPEZ y SANDRA URIBE

Resumen

En el presente estudio se registra por primera vez la presencia del grupo *Anopheles (Kerteszia) boliviensis* en un bosque montano del municipio de Jardín, Antioquia (2400 msnm). Especímenes adultos e inmaduros que fueron previamente identificados por morfología como de este grupo, se tipificaron con base en dos marcadores genéticos de origen mitocondrial (*Cytb* y *cox1*) y se analizó la variabilidad genética y la asignación en haplogrupos. Tres grupos altamente diferenciados fueron encontrados, los cuales podrían corresponder a las tres especies previamente descritas del grupo. Se discute este hallazgo en relación con el conocimiento previo del grupo y las limitaciones taxonómicas desde la morfología para la separación de las especies del complejo.

Palabras Clave: *Anopheles Kerteszia*, complejo de especies, ecosistemas de altura, mosquitos.

Abstract

In this work is recorded the presence of the *Anopheles (Kerteszia) boliviensis* group for the first time in a montane forest in the municipality of Jardín, Antioquia (2400 masl). Adult and immature specimens that were previously identified by morphology as part of this group were typed based on two genetic markers of mitochondrial origin (*Cytb* and *cox1*) and the genetic variability and distribution in haplogroups were analyzed. Three highly differentiated groups were found, which could correspond to the three previously described species of the group. Findings are discussed in relation to the prior knowledge related to the group and the taxonomic limitations from the morphology for separating of the species from the complex.

Keywords: *Anopheles Kerteszia*, complex of species, montane forest ecosystem, mosquito

INTRODUCCIÓN

El subgénero neotropical (*Kerteszia*) del género *Anopheles* (Diptera: Culicidae) incluye especies vectoras de malaria a humanos y otras especies animales (Bickford *et al.*, 2007; Rosa-Freitas *et al.*, 1998). Este subgénero distribuido desde el sureste de México hasta el sureste de Brasil, está compuesto por 12 especies (Gonzales y Carrejo, 2009) y se caracteriza porque los estados inmaduros de sus especies se crían en el agua almacenada en bromelias con excepción de *An. bambusicolus*. En cuanto a los adultos, las hembras hematófagas son altamente antropofílicas y se alimentan preferiblemente en horas del día y de la tarde, de lo que deriva su potencial impacto en salud pública, encontrándose en el subgénero vectores potenciales de malaria, arbovirus y filariasis, con registros importantes en varios países de Latinoamérica (Forattini, 2002; Krzywinski *et al.*, 2001; Roca-García, 1944).

La especie *Anopheles boliviensis* s.s fue descrita por primera vez en 1905 en Songo, Bolivia a partir de una sola hembra (Theobald, 1905). Actualmente la información taxonómica sobre esta especie es incompleta debido a la inexistencia de descripciones de estados inmaduros (huevo, larva y pupa) y del macho. No obstante, su presencia se ha registrado en Colombia en los departamentos de Caldas, Cauca, Chocó, Cundinamarca, Huila, Meta, Nariño y Tolima (González & Carrejo, 2009; SEM, 1957).

Navarro, Ventura, Zorrilla, & Liria (2010), han reportado el hallazgo de *An. boliviensis* en simpatria con las especies *An. rollai*, y *An. gonzalezrinconesi*. Estas tres especies han sido denominadas como “grupo *boliviensis*”, y se caracterizan por estar presentes en zonas montañosas altoandinas, como se encontraron en el Parque Nacional Dinira, Venezuela a 2232 msnm de altitud (Navarro *et al.*, 2010).

La clave taxonómica para hembras adultas más reciente para el subgénero *Kerteszia*: “Key to the females of *Anopheles* (*Kerteszia*)”, (Harrison *et al.*, 2012), permite identificar los especímenes solamente hasta “grupo *boliviensis*”, debido a la similitud de caracteres morfológicos entre las especies que lo conforman y en general aquellas que hacen parte del subgénero, siendo ampliamente aceptado que se requiere trabajo adicional para avanzar en la taxonomía del grupo y en la identificación de cada una de las especies con base en criterios morfológicos.

Como evidencia de las dificultades taxonómicas del grupo, se considera la asignación errónea de ejemplares revisados por Komp & Osorio (1936), como larvas y machos, a la especie *An. boliviensis*. Posteriormente se encontró que dichos ejemplares realmente correspondían a la especie *An. lepidotus* (Zavortink, 1973). De forma similar confusiones entre especies como *An. phollidotus* y *An. lepidotus* han ocurrido en Colombia con implicaciones importantes relacionadas con la epidemiología de la enfermedad (Quiñones *et al.*, 1984, Harrison *et al.*, 2012).

De acuerdo con Navarro *et al* (2010), las especies del “grupo *boliviensis*” se diferencian en su fase adulta de otras del subgénero *Kerteszia* como *An. lepidotus* y *An. pholidotus* por la ausencia de una franja de escamas ancha y curva en la sección superior del mesanepimeron (Mam) (Cova-García *et al.*, 1977).

Las especies *An. rollai* y *An. gonzalezrinconesi* pueden separarse utilizando caracteres taxonómicos morfológicos en la larva, la pupa y genitalia del macho (Cova-García *et al.*, 1977). Sin embargo, no se cuenta con ejemplares adultos montados disponibles de ambas especies para hacer un estudio taxonómico detallado. (Harrison *et al.* 2012). No se dispone o conoce la genitalia del macho de *An. boliviensis* s.s (Komp 1937, Harrison *et al.*, 2012).

En el presente estudio se registra la presencia del grupo en un bosque montano del municipio de Jardín, Antioquia. Especímenes adultos e inmaduros previamente identificados por morfología como del grupo *An. boliviensis*, se tipificaron con base en dos marcadores genéticos de origen mitocondrial (*Cytb* y *cox1*) y se analizó la variabilidad genética y la asignación en haplogrupos de larvas y adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Colección de especímenes e identificación taxonómica

Las colectas de los mosquitos se realizaron en un bosque húmedo montano localizado en la reserva forestal “La Playa. Se utilizaron trampas tipo Shannon (entre las 17:00 a 20:00 horas) y aspiradores bucales para la búsqueda activa de adultos entre las 12:00-13:00 horas. Para el muestreo de los estados inmaduros se utilizaron pipetas plásticas para extraer el agua contenida en bromelias. Los individuos adultos fueron identificados siguiendo la clave taxonómica más reciente para el subgénero elaborada por Harrison *et al.*, (2012). Las larvas fueron criadas en condiciones de laboratorio hasta la obtención de adultos.

b) Obtención de las secuencias de ADN

La extracción de ADN fue realizada a partir de dos patas de los mosquitos, según el método de Buffer de macerado de Collins, Porter, & Cope (1990) modificado por Uribe (1999). Se amplificó el extremo 3' del gen mitocondrial *Cytb*, el *ARNtser* y el extremo 5' del gen ND1 mediante los oligonucleótidos CB3FC (CAYATTCAACCGAATGATA) y NINFR (GGTAYWTTGCCTCGAWTTCGWTATGA) diseñados por Beard, Hamm, & Collins (1993).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador PTC100 (MJ research). La verificación de la amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con el colorante GelStar (Lonza Bioscience). El producto de PCR se purificó mediante filtración al vacío y membrana de exclusión por tamaño, siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Millipore PCR96 Clean Up Kit). Finalmente se envió el producto a MacroGen (New York, USA) para su secuenciación en ambos sentidos de la cadena.

Igualmente se amplificó la región conocida como código genético de barras del gen Citocromo oxidasa I (*cox1*) mediante los oligos MTNF (5'-GGATTTGGAAATTGA-

TTAGTTCCTT-3') y MTNR (5'-AAAAATTTTAATTCCAGTTGGAACAGC-3') diseñados por Kumar *et al.* (2007). Para obtener las secuencias se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

c) Análisis de las secuencias

Las secuencias fueron editadas usando el programa Geneious 6 (Kearse *et al.*, 2012). El alineamiento se realizó mediante el programa Clustal W 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Se realizó un dendrograma de Neighbor Joining (NJ) basado en valores de divergencia nucleotídica con distancias no corregidas (p) con el fin de observar gráficamente las agrupaciones entre individuos de la población. Una vez conocidos los grupos se calcularon las mismas distancias (p) dentro y entre ellos. Igualmente se calculó la composición nucleotídica, el número de sitios polimórficos, sitios conservados y sitios únicos y el número de transiciones y transversiones. Los análisis anteriores se realizaron usando MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). Se recurrió al software DnaSP v 6 (Rozas *et al.*, 2017) para calcular los siguientes parámetros: diversidad nucleotídica (Pi) (Antunes, 1937) y diversidad haplotípica (h) (Nei, 1987), número medio de diferencias nucleotídicas (k) (Tajima, 1983) número medio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones (Dxy) (Nei, 1987) usando el método de Jukes Cantor (Jukes & Cantor, 1969), número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones (Da) (Nei, 1987) y la medida de diferenciación genética entre poblaciones (FST) (Hudson *et al.* 1992). También se realizó el test de Tajima (D) para probar la neutralidad de los cambios nucleotídicos encontrados comparando haplotipos únicos y variables en la población (Tajima, 1989).

Finalmente, con el fin de inferir las relaciones entre los haplotipos encontrados se realizó una red de parsimonia estadística mediante el método de Templeton *et al.* (1992) en el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). El mismo análisis se llevó a cabo en el programa Networks 4.6 mediante el algoritmo median joining (<http://www.fluxus-engineering.com>).

RESULTADOS

Se registra por primera vez la presencia de *Anopheles* del “grupo *boliviensis*” en Antioquia en un bosque (bmh - MB) localizado a 2400 msnm en el municipio de Jardín. Los mosquitos adultos identificados corresponden a 25 hembras, 22 de ellas capturadas en trampa Shanon y 3 por búsqueda activa colectadas en reposo entre las 12:00 y las 13:00 horas en el borde del bosque. Igualmente se obtuvo de la cría de inmaduros un macho.

Se obtuvieron 19 secuencias de ADN mitocondrial correspondientes al extremo 3' del gen *Cytb*, el *ARNtser* y el extremo 5' del gen *NAD1* y 12 secuencias del fragmento del gen citocromo c oxidasa *coxI*. El extremo 3' del gen Citocromo B secuenciado corresponde a 324 bp, el extremo 5' del gen *ND1* a 118 bp y el *ARNtser* completo a 66bp. El primer espaciador intergénico se encontró en algunos especímenes con 4bp mientras que en los otros este espaciador se ha perdido

y el último codón de parada de citocromo B se solapó con el primer codón del *ARNt^{ser}*. El segundo espaciador intergénico fue de 24 bp.

Se encontraron 34 sitios polimórficos (6,4%) y 3 sitios únicos. El 61,7% de los sitios polimórficos se encontró en el extremo 3' del gen Citocromo B y el 14,71% en el extremo 5' del gen *ND1*. En el fragmento de citocromo b solo se encontró una sustitución no sinónima que generó un cambio de un aminoácido hidrofóbico (Ala) por otro hidrofóbico (Gly) y en el fragmento del gen *ND1*, una sustitución no sinónima de Leu por Met. Para el fragmento *Cytb*, el 85% de los cambios ocurrieron en la tercera posición del codón, seguido por la primera (9,5%) y luego la segunda posición (4,8%). La proporción entre transiciones/transversiones fue de 2,91.

La composición nucleotídica de las secuencias obtenidas es congruente con lo esperado para el genoma de insectos y el genoma mitocondrial de los mismos, donde prevalece Adenina y Timina; A (39,5%), T (39,8%), C (11,2%), G (9,5%).

Los valores obtenidos para los parámetros de variabilidad genética, S, h, Pi, k, Dxy, Da, aparecen en la Tabla 1 evidenciándose valores que reflejan variabilidad haplotípica y diversidad nucleotídica altas.

Tabla 1. Parámetros de variabilidad genética para los grupos encontrados con base en las secuencias de gen *Cytb*.

Valor	Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo
Número de sitios polimórficos	34	1	2	5	
Haplotipos	10	2	3	5	
Diversidad haplotípica, Hd	0,91813	0,57143	0,8333	0,85714	
Diversidad nucleotídica, Π	0,02456	0,00109	0,00191	0,00320	
Diversidad nucleotídica, Π con JC		0,00109	0,00191	0,00321	
Numero de diferencias promedio, k	12,87135	0,57143	1,00000	1,67857	

El dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) arrojó 3 agrupaciones bien definidas, (Figura 1) las cuales se designaron como Grupo A, Grupo B y Grupo C, con distancias genéticas netas (p) significativas entre ellos, de alrededor del 3%, mientras que dentro de cada grupo éstas oscilaron entre el 0,01-0,03%. (Tabla 2 - 3).

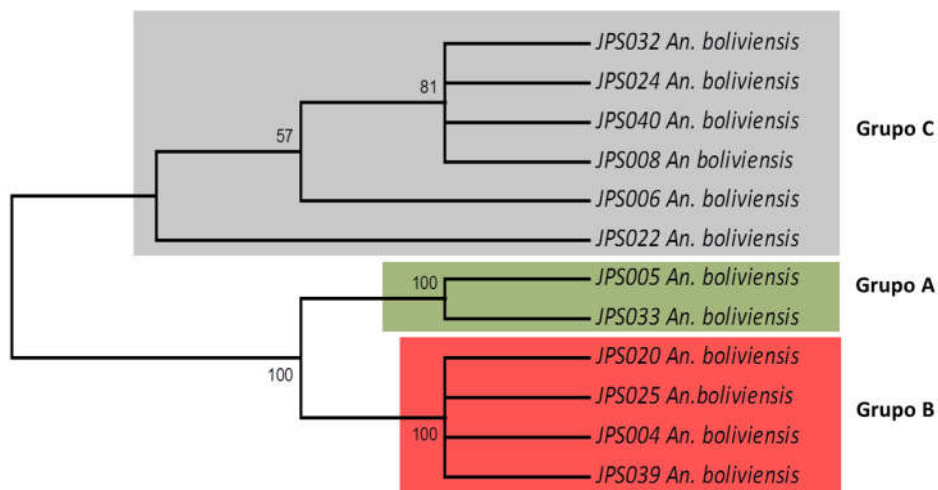


Figura 1. Dendrograma de Neighbor-Joining. Bootstrap 10.000. Distancias (p). *Cytb*.

Tabla 2. Distancias genéticas netas (p) entre grupos. La diagonal inferior muestra las distancias y la superior, el error estándar. según *Cytb*.

	A	Grupo B	Grupo C	Grupo
Grupo A			0,00731	0,00772
Grupo B	0,03381			0,00755
Grupo C	0,03687	0,03328		

Tabla 3. Medidas de divergencia entre poblaciones según *Cytb*.

		#Sitios polimórficos	# dif nt entre poblaciones	Dxy	Dxy(JC)	Da	Da(JC)
Grupo A	Grupo B	19	17,714	0,03381	0,03459 +- 0,01335	0,03231	0,03309 +- 0,01336
Grupo A	Grupo C	22	19,321	0,03687	0,03781 +- 0,01107	0,03473	0,03566 +- 0,01107
Grupo B	Grupo C	21	17,438	0,03328	0,03404 +- 0,01017	0,03072	0,03148 +- 0,01017

El producto amplificado del extremo 5' del gen *cox1* secuenciado correspondió a 621 bp. Con 45 sitios polimórficos (7.24%) y 3 sitios únicos.

La composición nucleotídica fue congruente con lo esperado para el genoma de insectos y el genoma mitocondrial donde prevalece Adenina y Timina; A (31,2%), T (38,2%), C (15,2%), G (15,5%). Igualmente, el 95,5% de las sustituciones nucleotídicas ocurrieron en la tercera posición

del codón y el 4.5% en la primera posición. Todas las sustituciones fueron sinónimas. La proporción transiciones/transversiones fue de 2,35.

Los valores obtenidos para los parámetros de variabilidad genética, S, h, Pi, k, Dxy, Da aparecen en las Tablas 4 - 7.

Tabla 4. Distancias genéticas netas (p) dentro de los grupos según *cox1*.

		Distancia	Desviación Estándar
C	Grupo	0,00269	0,001153
	Grupo	0	0
B	GrupoA	0,00322	0,002242

Tabla 5. Distancias genéticas netas (p) entre grupos. La diagonal inferior muestra las distancias y el superior, el error estándar, según *cox1*.

		Grupo	Grupo B	Grupo C
A	Grupo		0,007693	0,007980
	Grupo	0,046699		0,008118
B	Grupo	0,048309	0,046431	
C	Grupo			

Tabla 6. Distancias genéticas (K2P) entre grupos. La diagonal inferior muestra las distancias y el superior, el error estándar, según *cox1*.

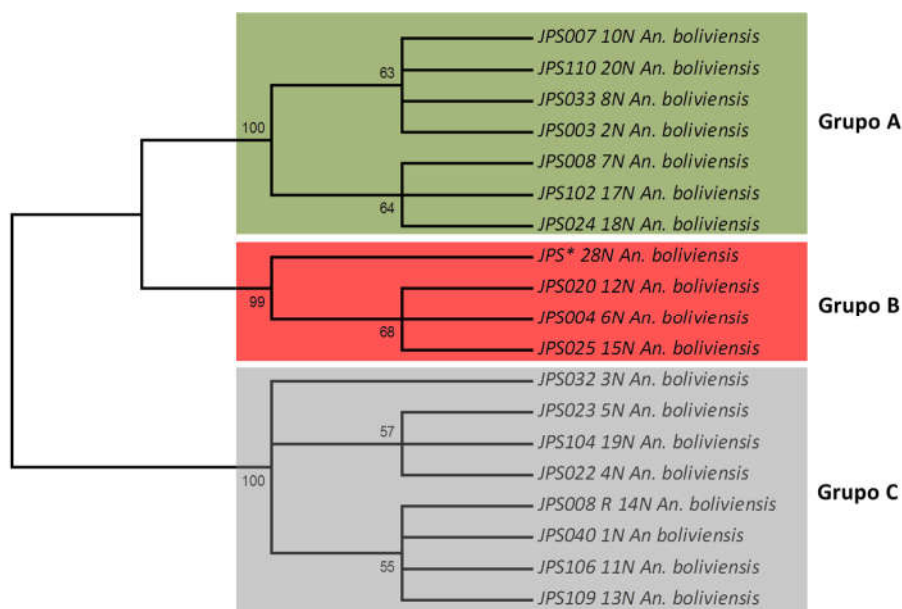
		Grupo A	Grupo B	Grupo C
A	Grupo		0,008355753	0,008761246
	Grupo	0,048368214		0,008456999
B	Grupo	0,050297881	0,048109942	
C	Grupo			

Tabla 7. Parámetros de variabilidad genética entre y dentro de los grupos.

Valor	Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Número de sitios polimórficos	45	2	0	5
Haplotipos	6	2	1	3
Diversidad haplotípica, Hd	0,81818	1,00000	0,00000	0,60000
Diversidad nucleotídica, Π	0,03199	0,00322	0,00000	0,00268
Diversidad nucleotídica, Π con JC		0,00323	0,00000	0,00269
Numero de diferencias promedio, k	19,86364	2,00000	0,00000	1,66667
Transiciones / transversiones	2,35			

De manera congruente con lo reportado con el fragmento anterior, se encontró una alta variabilidad haplotípica y diversidad nucleotídica.

Igual que con el marcador que incluye el fragmento *Cytb*, el dendrograma de Neighbor-Joining (NJ) *coxI*, Figura 2, arrojó 3 agrupaciones bien definidas, las cuales se designaron de la misma manera A, B, C. Las distancias genéticas encontradas fueron mayores a las encontradas con el fragmento que incluye citocromo B y estuvieron alrededor del 4-5%, mientras que dentro de cada grupo éstas oscilaron entre el 0,01-0,03%. (Tabla 5 - 7).

**Figura 2.** Dendrograma de Neighbor-Joining. Bootstrap 10.000 para el fragmento que incluye *coxI*.

El análisis de conexiones haplotípicas mediante parsimonia estadística (TCS) para ambos marcadores, reveló tres redes no conectadas, (Figura 3) correspondientes a cada uno de los grupos designados en el Dendrograma NJ, sugiriendo 3 grupos con alto grado de estructuración como lo indica los índices F_{st} (Hudson *et al.*, 1992) los cuales oscilaron entre 0,92 y 0,97 para ambos marcadores (Tabla 8 - 9).

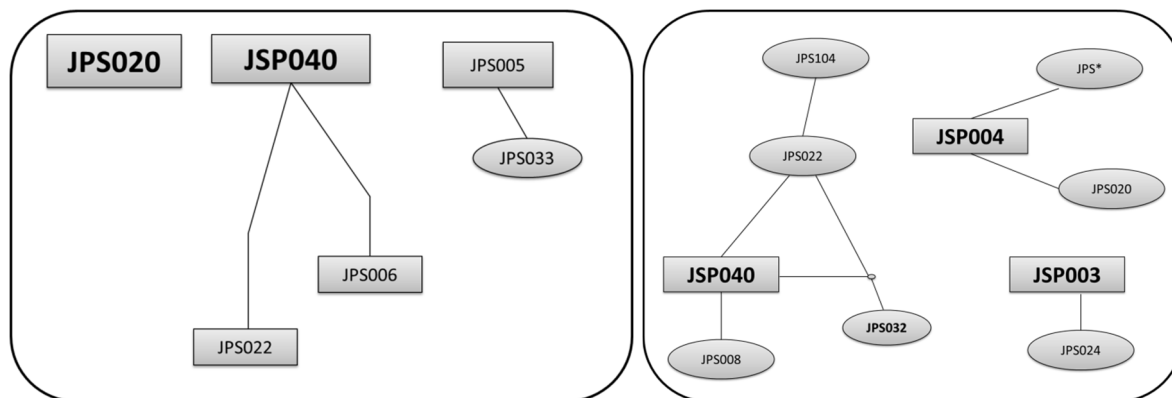


Figura 3. Análisis de conexiones haplotípicas (TCS parsimonia estadística) para *cox1* (Izquierda) y fragmento que incluye *Cytb* (derecha).

Tabla 8. Parámetros de diferenciación genética y flujo génico.

Población1	Población2	F_{st}	
		según <i>Cytb</i>	según <i>cox1</i>
Grupo A	Grupo B	0,95565	0,96552
Grupo A	Grupo C	0,94177	0,93889
Grupo C	Grupo C	0,92320	0,97110

Tabla 9. Parámetros de variabilidad genética en toda la muestra procedente de Jardín.

Valor	Según <i>Cytb</i>	Según <i>cox1</i>
Número de sitios polimórficos	34	45
Haplotipos	10	6
Diversidad haplotípica, H_d	0,91813	0,81818
Diversidad nucleotídica, Π	0,02456	0,03199
Numero de diferencias promedio, k	12,87135	19,86364
Transiciones /transversiones	2.91	2.35

DISCUSIÓN

El presente trabajo corresponde al primer registro sobre la presencia del “grupo boliviensis” en ecosistemas de altura para el departamento de Antioquia. Tres variantes o haplogrupos definidos con base en dos marcadores moleculares y con distancias similares a las que diferencian especies crípticas en mosquitos, hacen presuponer un caso similar al descrito inicialmente por Navarro *et al.* (2010) en el parque natural Dinira, localizado en la cordillera andina de Venezuela donde el grupo de las tres especies *An. rollai*, *An. gonzalezrinconesi* y *An. boliviensis* denominado “grupo boliviensis” fue encontrado en simpatría a 2232 msnm. de altitud.

Hasta ahora, *An. boliviensis* había sido la única especie del grupo registrada para Colombia. La distribución geográfica más completa aparece en la revisión hecha por (González & Carrejo, 2009) basándose en los archivos del Servicio de Erradicación de la Malaria (SEM, 1957), publicaciones entomológicas históricas y las etiquetas y especímenes del museo entomológico de la Universidad del Valle. Sin embargo, estos autores sostienen que “es posible que para algunas especies anotadas en el registro histórico de algunos municipios sea difícil verificar su existencia actual en algunas localidades, debido a cambios drásticos en el hábitat de la especie, pero también es posible que algunos especímenes no hayan sido específicamente bien determinados, debido a los problemas taxonómicos que han presentado algunas especies.

Para el caso de la especie *An. boliviensis*, se conoce que la descripción original fue hecha a partir de una sola hembra recolectada en Songo (Bolivia) por (Theobald, 1905). Posteriormente se aceptó que Komp & Osorio (1936) habían descrito la larva y la genitalia del macho de la especie, hasta que Zavortink (1973) en su revisión del subgénero *An. Kerteszia* hizo una corrección de este último trabajo, en la cual confirmó que realmente se trataba de la especie *An. lepidotus*.

La mayoría de los especímenes revisados en el presente estudio desde la perspectiva morfológica y molecular, corresponden a hembras, con excepción de un macho cuya genitalia fue estudiada en detalle (datos no mostrados). Las secuencias correspondientes a este espécimen se incluyeron en el haplogrupo llamado “C”. Cuando la genitalia de este macho se comparó con las observaciones morfológicas para las especies *An. gonzalezrinconesi* y *An. rollai* de Venezuela, las diferencias encontradas fueron evidentes, específicamente en el edeago, lo cual hace suponer que el macho encontrado, podría corresponder a la especie *An. boliviensis*. Sin embargo, no se dispone de especímenes tipo macho montados para esta especie con el cual pudiera verificarse la identidad, ya que la mayoría de las colecciones reconocidas y publicadas solo se refieren a hembras adultas como las del Museo Nacional de Estados Unidos, hoy Museo Smithsonian (Harbach, 2007; Komp, 1937).

Según la última clave taxonómica disponible para hembras del subgénero *Kerteszia* (Harrison *et al.*, 2012) no es posible separar las tres especies del “grupo boliviensis” y de acuerdo con el autor, esto es especialmente cierto en ausencia de especímenes criados en el laboratorio de

An. gonzalezrinconesi y *An. rollai*. Así, sin los machos y estados inmaduros conocidos de *An. boliviensis*, es aún más complejo determinar las relaciones entre las tres especies.

Los análisis de diferencias entre secuencias nucleotídicas de marcadores como los usados en este estudio, tienen poder de resolución capaz de detectar subdivisión de poblaciones y aún variación en especies crípticas o estrechamente relacionadas, lo cual ha sido particularmente cierto en mosquitos (Ahumada *et al.*, 2016; Lopez-Rubio *et al.*, 2017). En este caso, se observó una gran estructuración y diferenciación genética entre las agrupaciones soportadas por valores considerables de *Fst* y agrupaciones por NJ. Dicha estructuración evidentemente no ocurre en respuesta a barreras geográficas ya que los individuos estudiados aquí, representan grupos que coexisten en la misma localidad. Las redes de parsimonia estadística no conectadas podrían sugerir un proceso de especiación incipiente o la presencia de tres entidades diferentes. En este contexto, varios estudios indican que cada especie forma una red de parsimonia estadística no conectada; sin embargo, dado el número relativamente bajo de especímenes no se considera un análisis concluyente y podría tratarse de una sola especie altamente polimórfica, lo cual valdría la pena revisar con un mayor número de muestras. No obstante, los especímenes de este grupo no fueron particularmente abundantes en campo y fueron difíciles de coleccionar en mayor cantidad a pesar de nuevos intentos de colecta.

Vale la pena resaltar que las especies del grupo *An. boliviensis* se encuentran dentro de los registros de mosquitos colectados a mayores alturas (González & Carrejo, 2009; Navarro *et al.*, 2010; Zavortink, 1973). Las especies en Venezuela fueron colectadas a 2232 m.s.n.m en el Parque Nacional Dinira. En el presente estudio de manera congruente, se reporta la presencia de dicho grupo como mosquitos de alta montaña a 2400 m.s.n.m en Jardín. Previos reportes verificados por González & Carrejo (2009), de *An. boliviensis* incluyen el departamento de Caldas (Manizales), a una altura no especificada. Otras alturas registradas deberían ser revisadas incluyendo la observación de los especímenes y verificando su identidad taxonómica que, dada la historia y dificultades del grupo, podría no corresponder a esta especie.

El presente estudio representa un aporte al conocimiento del “grupo *boliviensis*”. Sin embargo, aspectos como los sitios de cría, altura sobre el nivel del mar y estudios adicionales para encontrar caracteres morfológicos que permitan diferenciar los grupos y revisar la morfología de los machos y de los inmaduros, podrían ayudar a resolver el estatus taxonómico de *An. boliviensis* y las demás especies del grupo. Un análisis combinado de morfología y molecular sería deseable para aclarar la taxonomía y delimitar las especies.

La secuencia código genético de barras usada en el presente estudio corresponde a la amplificada por los oligonucleótidos descritos por Kumar *et al.* (2007). No obstante, en el campo de la entomología médica y en particular en la familia Culicidae hay un número creciente de secuencias obtenidas con los oligos propuestos por Folmer *et al.* (1994) los cuales permitirán en un futuro cercano, análisis completos del subgénero *Kerteszia*, del género *Anopheles*, desde la perspectiva molecular, razón por la cual se continúa trabajando con dicha región en el grupo. La

disponibilidad de especímenes, inmaduros y adultos, para revisar la sistemática del subgénero, y en particular del complejo *boliviensis*, continúa siendo un limitante.

REFERENCIAS

- Ahumada, M. L., Orjuela, L. I., Pareja, P. X., Conde, M., Cabarcas, D. M., Cubillos, E. F. G., ... Quiñones, M. L. (2016). Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria Journal*, 15(1), 407.
- Antunes, P. C. A. (1937). Informe sobre una investigación entomológica realizada en Colombia. *Revista de La Facultad de Medicina, Bogotá*, 6(2), 65–87.
- Beard, C. B., Hamm, D. M., & Collins, F. H. (1993). The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology*, 2(2), 103–124.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L. L., Meier, R., Winker, K., ... Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659.
- Collins, F. H., Porter, C. H., & Cope, S. E. (1990). Comparison of rDNA and mtDNA in the sibling species *Anopheles freeborni* and *A. hermsi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42(5), 417–423.
- Cova-García, P., Pulido, J., & Escalante de Ugueto, C. (1977). *Anopheles (Kerteszia) rollai*, nomen novum *Anopheles (Kerteszia) hilli* Cova García, 1976 (non *Anopheles hilli* Woodhill & Lee 1944). *Boletín de La Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, 17(3), 241.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Forattini, O. (2002). *Culicidologia Médica Vol. 2*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 864 p.
- González, R., & Carrejo, N. (2009). *Introducción al estudio taxonómico de Anopheles de Colombia: Claves y notas de distribución*. Cali: Programa Editorial Universidad del Valle. 260 p.
- Harbach, R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*. *Zootaxa*, 1668(0), 591–638.

Harrison, B. A., Ruiz-lopez, F., Falero, G. C., Savage, H. M., Pecor, J. E., & Wilkerson, R. C. (2012). *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*, 3218, 1–17.

Hudson, R. R., Slatkint, M., & Wayne, P. (1992). Estimation of Levels of Gene Flow From DNA Sequence Data. *Genetics*, 132(2), 583–589.

Jukes, T., & Cantor, C. (1969). Evolution of protein molecules. In *In Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3 (1969), pp. 21-132.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647–1649.

Komp, W. (1937). The species of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera, Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 30(3), 492–529.

Komp, W., & Osorio, E. (1936). The male and larva of *Anopheles (Kerteszia) boliviensis* Theobald. *Annals of the Entomological Society of America*, 29, 415–418.

Krzywinski, J., Wilkerson, R. C., & Besansky, N. J. (2001). Toward understanding Anophelinae (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and the weight of evidence. *Systematic Biology*, 50(4), 540–556.

Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007). DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44(1), 1–7.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.

Lopez-Rubio, A., Suaza, J. D., Porter, C., Uribe, S., Bedoya, G., & Vélez, I. D. (2017). Phylogenetic signal at the *Cytb*-SertRNA-IG1-ND1 mitochondrial region in *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913. *Biomédica*, 37(2), 143–154.

Navarro, J.-C., Ventura, F. Del, Zorrilla, A., & Liria, J. (2010). Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58(1), 245–254.

Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press. 512 p.

Quiñones, M., Suárez, M., Rodríguez, A., Fleming, G. A., & Galvis, L. E. (1984). Comportamiento de *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* zavortink, 1973 y su discriminación como

posible vector de malaria en el departamento del Tolima Colombia (1). *Biomédica*, 4(1), 5-13.

Roca-García, M. (1944). The Isolation of Three Neurotropic Viruses from Forest Mosquitoes in Eastern Colombia. *The Journal of Infectious Diseases*, 75(2), 160–169.

Rosa-Freitas, M. G., Lourenço-de-Oliveira, R., Carvalho-Pinto, C. J. de, Flores-Mendoza, C., & Silva-do-Nascimento, T. F. (1998). Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 651–655.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 1–4.

SEM (Servicio de Erradicación de la Malaria. Ministerio de Salud Pública. República de Colombia). (1957). *Plan de erradicación de la Malaria en Colombia. Vol. II.* (M. de S. Pública, Ed.). Bogotá. 635 p.

Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437–460.

Tajima, F. (1989). b Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance , and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–279.

Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132(2), 619–633.

Theobald, F. (1905). A Catalogue of the Culicidae in the Hungarian National Museum. *Annales Musei Nationalis Hungarici*, 3, 61–119.

Zavortink, T. J. (1973). Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 9(3), 1–54.

4. Phylogenetic signal at the *Cytb-SertRNA-IG1-ND1* mitochondrial region in *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913

[Artículo publicado en *Biomédica*, 37 (Supl.2):143-154, (2017)]



Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia

ANDRÉS LÓPEZ-RUBIO¹, JUAN SUAZA-VASCO¹, PAULA L MARCET², NATALIA RUÍZ-MOLINA¹, LORENZO CÁCERES³, CHARLES PORTER² & SANDRA URIBE¹

¹Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín – Facultad de Ciencias – Escuela de Biociencias – Grupo de Investigación en Sistemática Molecular. Calle 53A 63-20, Medellín. Código Postal 050034 – Colombia. E-mail: andreslop27@gmail.com

²Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Division of Parasitic Diseases and Malaria, Entomology Branch. Atlanta, USA

³Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Ave. Justo Arosemena y Calle 35, Apartado Postal N° 0816-02593, Panamá, República de Panamá

Abstract

A reference 535 bp barcode sequence from a fragment of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (*COI*), acquired from specimens of *An. neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913 from its type locality in Panama, was used as a tool for distinguishing this species from others in the subgenus *Kerteszia*. Comparisons with corresponding regions of *COI* between *An. neivai* and other species in the subgenus (*An. bellator* Dyar & Knab 1906, *An. homunculus* Komp 1937, *An. cruzii* Dyar & Knab, 1908 and *An. laneanus* Corrêa & Cerqueira, 1944) produced K2P genetic distances of 8.3–12.6%, values well above those associated with intraspecific variation. In contrast, genetic distances among 55 specimens from five municipalities in the Colombian Pacific coastal state of Chocó were all within the range of 0–2.5%, with an optimized barcode threshold of 1.3%, the limit for unambiguous differentiation of *An. neivai*. Among specimens from the Chocó region, 18 haplotypes were detected, two of which were widely distributed over the municipalities sampled. The barcode sequence permits discrimination of *An. neivai* from sympatric species and indicates genetic variability within the species; aspects key to malaria surveillance and control as well as defining geographic distribution and dispersion patterns.

Key words: DNA Barcode, Malaria, *Kerteszia*, *COI*

Introduction

In the Neotropical region, Colombia is second only to Brazil in number of malaria cases each year (Chaparro & Padilla 2012). Among malaria vectors in Colombia, *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab, 1913 is often considered to be a secondary vector due to localized distribution, apparent natural infection rates and its larval habitat (Gutiérrez *et al.* 2008; Sinka *et al.* 2010). However, in the Pacific Coast of Colombia it may be considered a primary vector of malaria, especially in isolated municipalities where medical access is still limited such as Litoral de San Juan (Charambirá) and Santa Bárbara-Iscuandé (Astaiza *et al.* 1988; Murillo *et al.* 1988). Those municipalities are located within mangrove environments, which are ideally suited to *An. neivai*, a species that undergoes larval development in bromeliads. Within this region, in Buenaventura, Valle del Cauca, 4.76% of this species has been found to be naturally infected with *Plasmodium falciparum* (Gutiérrez *et al.* 2008). In the mangrove environment of this region, the relative abundance of *An. neivai* surpasses other known malaria vectors, such as *An. albimanus* Wiedemann, 1820, and its biting activity has been shown to peak at dawn and dusk, times of increased fishing activity by locals (Escovar *et al.* 2013).

From a phylogenetic perspective, *An. neivai* occurs within the subgenus *Kerteszia* Theobald, which includes several species associated with malaria transmission and whose larvae undergo development primarily in bromeliads located in forests (Zavortink 1973). While one of the earliest recognized species of the subgenus *Kerteszia*, it has an extensive geographic distribution extending from Chiapas, Mexico to Peru and Bolivia (Stone *et al.* 1959; Zavortink 1973). Distinguishing *An. neivai* often has been difficult; questionable records of its distribution exist, especially from topographic areas of relatively high elevation (González & Carrejo 2009).

Evidence from molecular variability in mitochondrial DNA fragments and variation in morphological characters suggests that the current concept of *An. neivai* may represent a complex of closely related species (Linton 2009; Montoya-Lerma *et al.* 1987). Several Neotropical species of *Anopheles* have been shown to consist of one or more sibling (cryptic) species (Rosa-Freitas *et al.* 1998). Even though closely related, such species may exhibit ecological and behavioral differences that may affect their malaria transmission potential or susceptibility to insecticides (Collins & Paskewitz 1996). Molecular markers are now being used to elucidate the presence of cryptic species within long established malaria vectors such as *An. cruzii*, *An. albitarsis* Lynch Arribálzaga, 1878, and *An. triannulatus* (Neiva & Pinto, 1922) (Gómez *et al.* 2013; Gutiérrez *et al.* 2010; Lehr *et al.* 2005; Rona *et al.* 2009, 2012; Rosero *et al.* 2012; Silva-do-Nascimento *et al.* 2011).

In the current study we evaluated a fragment of mitochondrial Cytochrome Oxidase I (*COI*), which represents the barcode region as described by Hebert *et al.* (2003, 2004). Standardized mitochondrial fragments from *COI* (DNA barcodes) have been used to identify mosquitoes (Cywinska *et al.* 2006; Harrison *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2007; Ruiz-Lopez *et al.* 2012), including species from the Colombian Andes (Rozo-Lopez & Mengual 2015). Also, in Colombia, DNA barcodes were used to distinguish *An. calderoni* Wilkerson, 1991, *An. punctimacula* Dyar & Knab, 1906 and *An. malefactor* Dyar & Knab, 1906; part of a closely related species group with high morphological similarities and of medical importance, especially with regard to *An. calderoni* (González *et al.* 2010). DNA barcodes also have been used to evaluate intraspecific variability, especially in some Neotropical *Anopheles* (Gutiérrez *et al.* 2010; Jaramillo *et al.* 2011; Mirabello & Conn 2006). Thus, when haplotype diversity in the malaria vector *An. darlingi* Root, 1926 was assessed among several municipalities in two western states of Colombia, many shared haplotypes were encountered, inferring a high level of gene flow (Gutiérrez *et al.* 2010). Similarly, in the same region of Colombia, low genetic differentiation was noted among populations of the malaria vector *An. nuneztovari* Gabaldon, 1940, where previous evidence suggests the existence of a species complex (Jaramillo *et al.* 2011).

The present study was designed to obtain a reference barcode sequence from specimens of *An. neivai* from its type locality in Panama and to evaluate the efficacy of this barcode region to differentiate *An. neivai* from other species in the subgenus *Kerteszia*. Also, haplotype diversity in *An. neivai* was evaluated over a similar size area as that described for *An. darlingi* and *An. nuneztovari* (Gutiérrez *et al.* 2010; Jaramillo *et al.* 2011) but for the distinctive Pacific coastal region of Colombia. Haplotype structure in *An. neivai* was further contrasted between the Colombian municipalities and the species' type locality in Panama.

Materials and methods

We collected specimens from the type locality at Portobelo, Colon Panama; as well as five municipalities within the Colombian department of Chocó: Acandí, Jurubidá, Nuquí, Bahía Solano, and Litoral de San Juan (Fig. 1, Table 1). The Colombian localities were chosen on the basis of epidemiological indications of malaria transmission (SEM 1957, Astaiza *et al.* 1988, INS 2015). While a few adult specimens were obtained using aspirators, most were collected as larvae and pupae in tank bromeliads and reared to adults under laboratory conditions similar to those described by Pecor & Gaffigan (1997). Fourth-stage larval and pupal exuviae, as well as male genitalia, associated with some of the reared specimens were mounted in Euparal following procedures presented by Pecor & Gaffigan (1997). Identification of many specimens ($n = 34$) was based on morphological characters as presented in Zavortink (1973), González & Carrejo (2009) and Harrison *et al.* (2012). Specimens were deposited at Museo Entomológico Francisco Luis Gallego, at Universidad Nacional de Colombia sede Medellín (MELFG). Additionally, thirty-one specimens were later identified on the basis of the *COI*-barcode sequences obtained, and added to the genetic pool for analysis.

Total DNA was extracted from each sample using the macerate method of Collins *et al.* (1987), as adapted by Uribe *et al.* (1998) and (Uribe *et al.* 2001) in a final elution volume of 50 μ L. A 650–700 bp fragment of the *COI*-barcode region was amplified with the primers described in Kumar *et al.* (2007) because the primers provided in Folmer (1994) failed to yield consistent positive amplicons. PCR amplification was carried out in a final volume of 30 μ L, including 6 μ L of GoTaq® 5X buffer (Promega), 1.2 μ L of dNTP (2.5 mM), 0.48 μ L of MgCl₂ (25 mM), 0.6 μ L of each primer, 0.18 μ L of GoTaq® DNA polymerase and 2 μ L of purified DNA. All PCR amplifications were verified using electrophoresis on a 1% agarose gel with Gelstar® (Lonza), only positive PCR products were purified for cycle sequencing using a MultiScreen®HTS Vacuum Manifold (EMD Millipore). DNA sequencing

was performed on both strands for each positive PCR product using BigDye 3.1® sequencing kit (ThermoFisher Scientific), in a 10 µL reaction including 2 µL ABI 5X dilution buffer, 0.5 µL Big Dye, 1 µL of primer and 2 µL of PCR product. Both strands were sequenced. Each sequencing reaction were purified using BigDye XTerminator® purification kit (ThermoFisher Scientific) using 45 µL of SAM solution, 10 µL XTerminator and 2 µL cycle sequencing for each sample. Finally, all samples were analyzed in an ABI 3500XL® (Applied Biosystems) automated capillary sequencer.

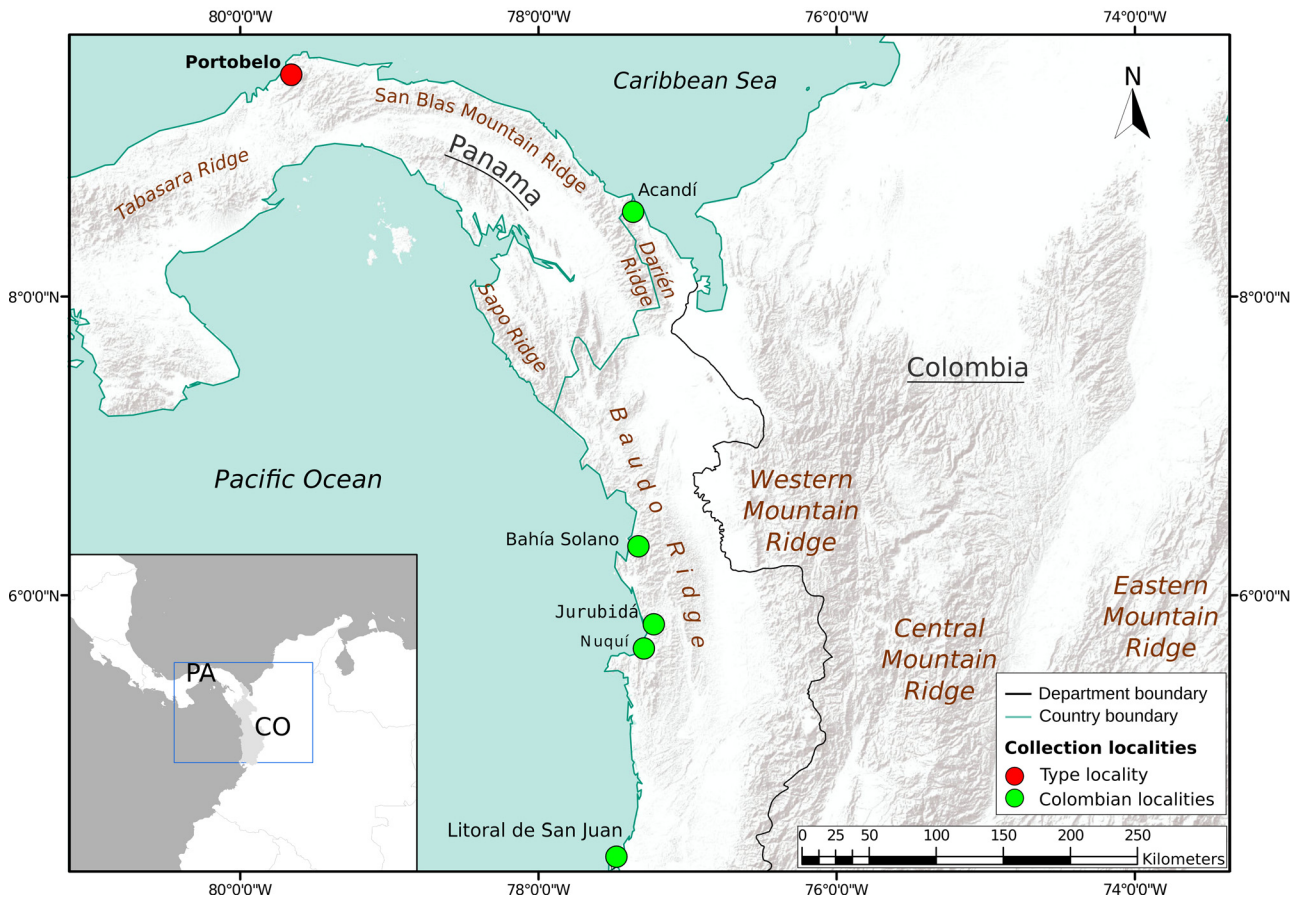


FIGURE 1. Collection municipalities map for *Anopheles neivai* in Colombia (CO) and Panama (PA).

Sequence quality was assessed with Sequence Scanner 1.0® (Applied Biosystems 2011) based on the quality estimators CRL and QV20. Consensus sequences were obtained with Bioedit 7.25 (Hall 1999) and Geneious® 6 (Kearse *et al.* 2012). A multiple alignment was constructed using Muscle (Edgar 2004). The final aligned data matrix was comprised of 535 base pairs. The presence of nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) was evaluated as in Hlaing *et al.* (2009). To verify the identity of the amplified region, the sequences were aligned with the whole mitochondrial genome of *An. albitarsis* (NCBI accession number NC020662). Sequences from the type locality were compared to deposited sequences of species in the subgenus *Kerteszia* in GenBank using the Blast algorithm implemented by Altschul *et al.* (1990) and, also, by using the Barcoding of Life (BOLD) Identification System (IDS) described by Ratnasingham & Hebert (2007). The sequences included were: *An. cruzii* (KU551285), *An. homunculus* (KU551283); *An. laneamus* (KU551288) as part of recent *Kerteszia* mitochondrial genome sequences from Oliveira *et al.* (2016), as well as those of *An. bellator* (KU551287), *An. lepidotus* Zavortink, 1973 (JQ041286) and *An. pholidotus* Zavortink, 1973 (JQ041288-87). In addition, sequence from a collected specimen of *An. marajoara* Galvao & Damasceno, 1942 and a *COI* sequence of *An. albitarsis* (NC020662) were included, since the subgenus *Nyssorhynchus* Blanchard is closely related to *Kerteszia* (Harbach 2013). No barcode sequences of *An. neivai* from the type locality were recovered from GenBank. From the BOLD database, 51 records of sequences described as *An. neivai* were retrieved, 33 of which originated from Colombia. However, none of the sequences have been published nor are they available from the BOLD database.

TABLE 1. Collection information for *Anopheles neivai* in Panama and Colombia and its associated haplotypes (based on a 535 bp *COI* alignment).

Country, Dept.	Municipality	n	Haplotype (n)	Capture site: [NCBI register/Museum Catalog No (life stage*)]
Panama, Colón	Portobelo (Pbelo) ^a	10	17 (5)	cs1 : [KM234373/NC_27056 (L), †KM234396 (L), †KM234409 (L), KM234433/NC_27057 (L)]
				cs2 : [KM234435/NC_27059(A)]
			18 (3)	cs1 : [†KM234385(L), †KM234400(L), †KM234429(L)]
		19 (2)	cs1 : [KM234402/NC_27058 (L), †KM234415(L)]	
Colombia, Chocó	Acandí (Aca)	2	‡1	cs3 : [†KM234371(F)]
			2	cs3 : [†KM229741(F)]
	Jurubidá (Juru)	10	‡1 (6)	cs4 : [KM234376/NC_27055 (F)]
				cs5 : [†KM234401(A), †KM234404(A), †KM234405(A), †KM234406(A), †KM234419(A)]
			‡8 (2)	cs5 : [†KM234398(A), †KM234425(A)]
			12	cs5 : [†KM234411(A)]
			20	cs5 : [†KM234387(A)]
	Nuquí (Nq)	3	‡8 (3)	cs6 : [†KM234403/ NC 26137 (M), †KM234432(F)]
				cs7 : [†KM234413/ NC 26136 (M)]
	Bahía Solano (BS)	21	3 (6)	cs8 : [KM234375(A), †KM234395(F), KM234397(A), KM234408(A), †KM234434(F)]
				cs9 : [†KM234412(F)]
			4	cs8 : [KM234389(A)]
			5	cs10 : [†KM234420(M)]
			6 (2)	cs11 : [†KM234379(M)]
				cs8 : [KM234416(A)]
			7	cs8 : [†KM234381(A)]
			‡8 (2)	cs8 : [KM234374(A), KM234378(A)]
10			cs8 : [†KM234388(F)]	
13 (2)			cs8 : [†KM234372(M), KM234424(A)]	
14			cs8 : [KM234417(A)]	
15	cs8 : [KM234384(A)]			
Litoral de San Juan (LSJ)	19	‡1 (9)	cs12 : [†KM234383(F), KM234386(A), KM234394(A), KM234399(A), KM234410(A), KM234426(A), KM234428(A), KM234430(A), †KM234431/NC 26433(F)]	
		‡8 (7)	cs12 : [KM234390(A), KM234393/NC_26391 (A), KM234414(A), †KM234418(F), †KM234421(F), KM234423(A), †KM234427(F)]	
		9	cs12 : [KM234422(A)]	
		11	cs12 : [KM234407(A)]	
		21	cs12 : [KM234392(A)]	

(*): [L: larvae, A: adult, M: adult Male, F: adult Female].

^aType locality for *An. neivai*.

cs: capture site

(†): species previously identified with taxonomy based in morphology, (‡): haplotypes found in several municipalities.

Polymorphism and haplotype diversity (H_d) in the *COI* barcoding region of *An. neivai* was evaluated using DNASP 5 (Librado & Rozas 2009). Intra- and inter-species variation (barcoding gap) was estimated from genetic distances based on the K2P model that distinguishes between transitions and transversions (Kimura 1980), available in MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). A threshold for barcode gap at the species level was calculated for detecting the possible presence of cryptic species using the SPIDER package (Brown *et al.* 2012), available in R 3.2 (R Development Core Team 2015). To further explore the existence of cryptic species associated to *An. neivai*, a statistical parsimony network was obtained using TCS 1 (Clement *et al.* 2000), based on previously identified haplotypes. Comparisons with other species in the subgenus *Kerteszia* and *An. albitarsis* were derived from K2P distances using criteria presented by Hebert *et al.* (2003) and Kumar *et al.* (2007). A K2P based dendrogram with bootstrap support was estimated using the APE package (Paradis 2012), also available in R.

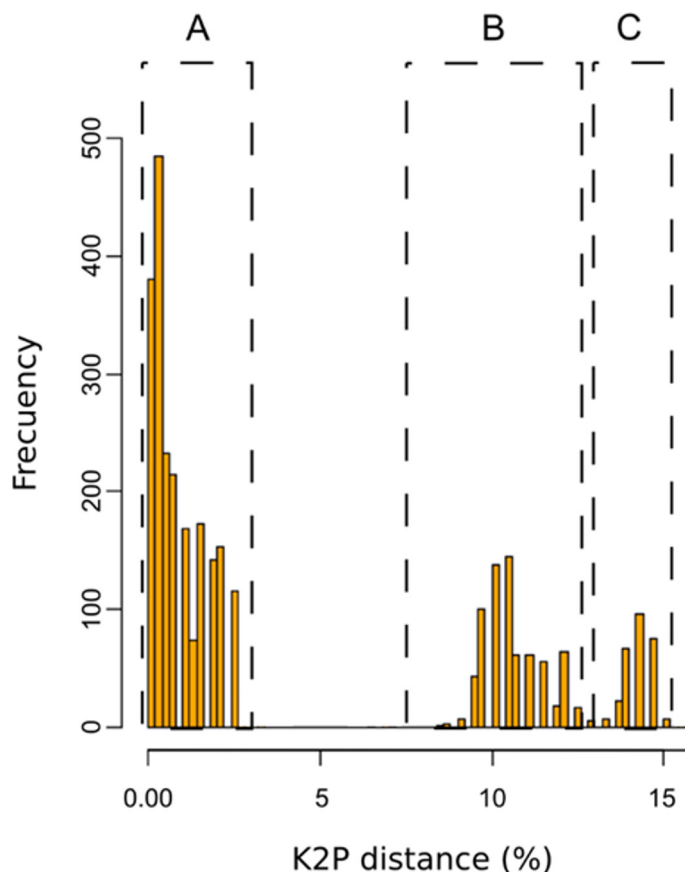


FIGURE 2. Genetic differences (K2P) among *An. neivai* collected specimens (A) and against other species from *Kerteszia* (B) and *Nyssorhynchus* from NCBI (C).

Results

Genetic variability within the 535 base pair barcode region of *COI* was examined for 65 individuals of *An. neivai*. Within the type locality ($n=10$), three haplotypes were encountered, which were divergent by four substitutions (Tables 1 and 2). These haplotypes were compared with sequences available in GenBank for other species of the subgenus *Kerteszia*. The pairwise genetic similarity between *An. neivai* and other species of *Kerteszia* ranged between 88–92%: *An. pholidotus* (90–91%), *An. lepidotus* (88–90%), *An. cruzii* (90%), and *An. homunculus* (92%). Differences between the sequences of *An. neivai*, other species of *Kerteszia* and *An. albitarsis* are presented in terms of genetic distance (K2P distances) in Fig. 2. In this figure the first dotted box (A) of the three distinct ranges presented represents intraspecies distances for *An. neivai*, which varied between 0–2.5%. The second range (B) represents the differences between *An. neivai* and other species in *Kerteszia* (*An. pholidotus*, *An. lepidotus*, *An. cruzii* and *An. homunculus*), which varied between 8.3 to 12.6%. The last range (C) represents differences between

specimens of *Kerteszia* and *An. albitarsis*, which varied from 13 to 15.2%. For *An. neivai*, a barcode threshold of 1.3% (Fig. 3) was calculated, indicating the limit at which accumulative errors are minimized and no concurrence occurs with the distance rank of specimens assigned to another taxonomic identity (species) nor are nonspecific DNA sequences present (false and positive negatives) (Brown *et al.* 2012). The neighbor joining dendrogram in Fig. 4 presents a summary of K2P distances and infers that all *An. neivai* sequences conform to a single cluster with 100% bootstrap support. Considered together, these results indicate a clear separation of *An. neivai* from other species in the subgenus *Kerteszia*.

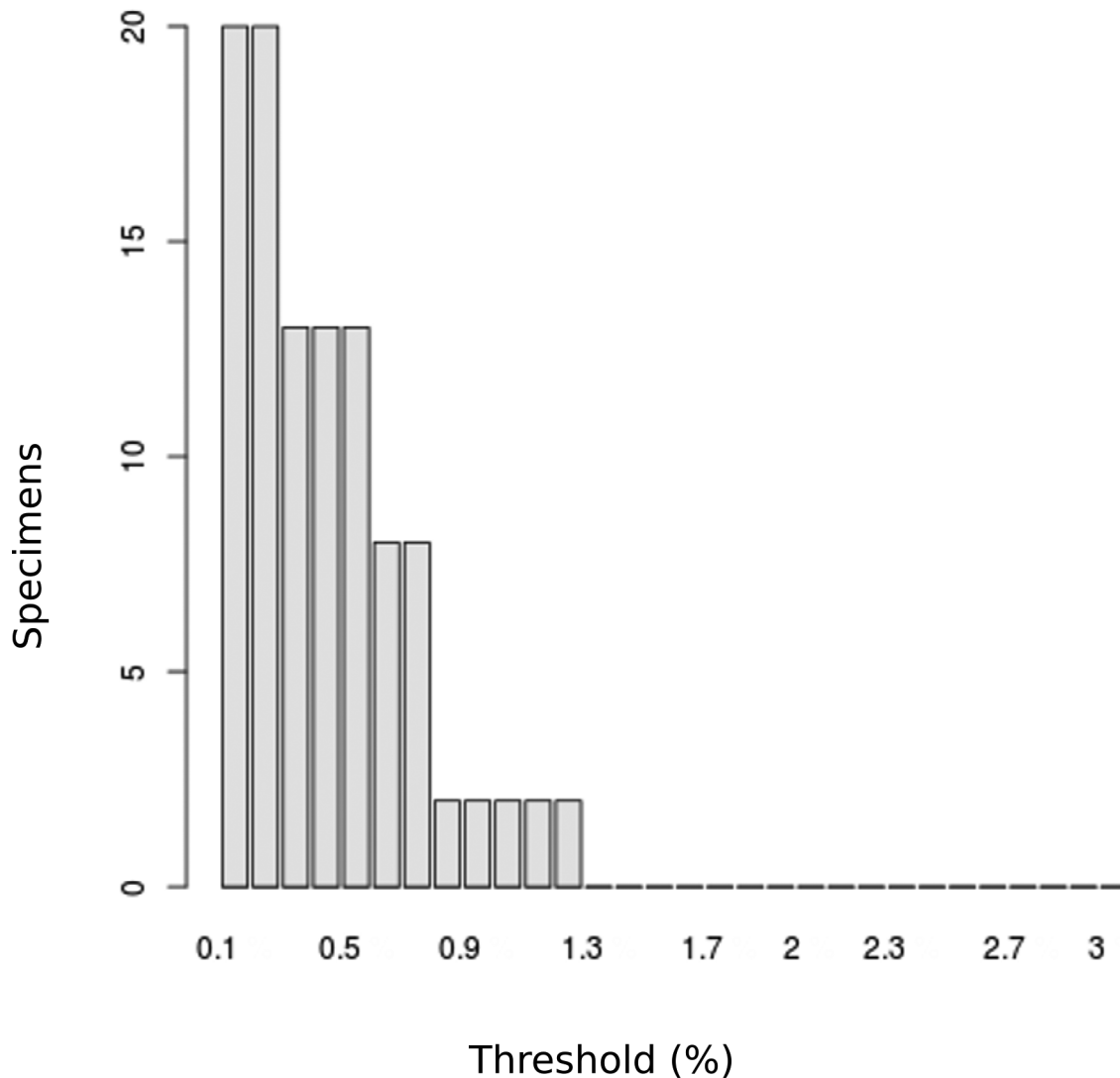


FIGURE 3. DNA barcode threshold optimization for *An. neivai*.

Among the 55 specimens of *An. neivai* from five municipalities in the Chocó region of Colombia, 18 *COI* haplotypes were detected in association with 26 polymorphic sites. All variation among these sites were transitions with the exception of a single transversion. The Colombian haplotypes varied from the Panamanian ones by 6–12 nucleotide differences (Table 2). A majority of the Colombian specimens were from the municipalities of Bahía Solano (21) and Litoral de San Juan (19). While 11 haplotypes were detected from Bahía Solano only 5 were observed from Litoral de San Juan. Two Colombian haplotypes (1 and 8), differing by a single transition, were the most frequently encountered with similar distributions spanning approximately 500 km. In addition, they exhibited a close relationship to most of the other Colombian haplotypes (Table 1, Fig. 5). Haplotype diversity (H_d), Nei (1987) ranged from 0 at Nuquí (3 specimens) to 0.99 at Bahía Solano (21 specimens), while in Litoral de San Juan (19 specimens) and Portobelo (10 specimens) H_d values were similar (0.67–0.69 respectively).

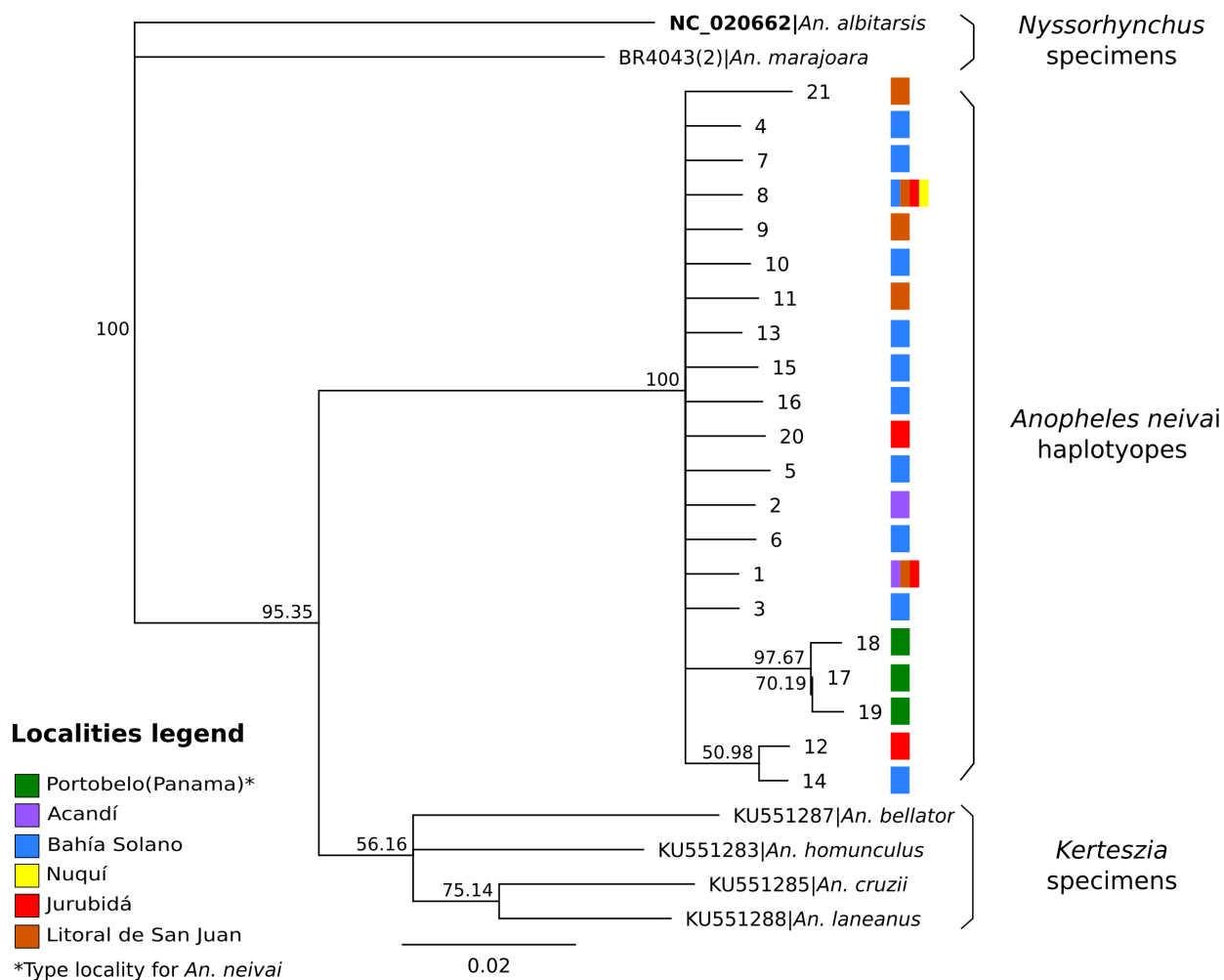


FIGURE 4. Dendrogram (K2P) for *An. neivai* specimens from Colombia, Panama, with other *Kerteszia* and *Nyssorhynchus* species (based on a 535 bp *COI* alignment. Branch support was provided by bootstrap resampling (10000 replicates).

Discussion

With an extensive geographic distribution and indications of both morphologic and molecular variability, emphasis was placed on developing a molecular marker for *An. neivai* based on specimens originating from its type locality in Panama (Linton 2009; Montoya-Lerma *et al.* 1987; Zavortink 1973). Despite of its usefulness for most metazoans, the barcode universal primers (Folmer 1994) do not always produce consistent PCR products for specimens preserved under differing conditions. Furthermore, presence of mutations at nucleotide positions where primers anneal require alternative primers sets in order to produce *COI* DNA barcodes (Hajibabaei *et al.* 2006; Kumar *et al.* 2007; Park *et al.* 2010). The 535 bp *COI* barcode region utilized in this study appears to clearly distinguish *An. neivai* from other species in *Kerteszia* (*An. bellator*, *An. homunculus*, *An. cruzii*, and *An. laneanus*) as revealed by K2P genetic distance divergences of 8.3–12.6%. This range is similar to the interspecific divergence (mean 8.2%, range 7.6–8.7%) derived from *COI* sequences by Harrison *et al.* (2012) for comparisons between *An. pholidotus* and *An. lepidotus*. Also, using the *COI* barcoding region, Linton (2009) observed interspecific differences averaging 7.2% among four species of *Kerteszia*. Furthermore, comparisons between Panamanian specimens of *An. neivai* and those from the Pacific coast of Colombia revealed only small differences in K2P distances, all less than 2.5%, and, thus, below the barcode limit of 4% (0–3.9 %) for defining a species [single taxonomic unit] (Cywinska *et al.* 2006; Escovar *et al.* 2012; Foster *et al.* 2013; Kumar *et al.* 2007; Ruiz-Lopez *et al.* 2010). In addition, Arregui *et al.* (2015) report differences from 3–7% between species complexes, such as *An. albitarsis* and *An. oswaldoi*, Peryassú, 1922. Considered together, these results indicate that the 535 bp *COI* barcoding region appears to be an effective tool for differentiating *An. neivai*.

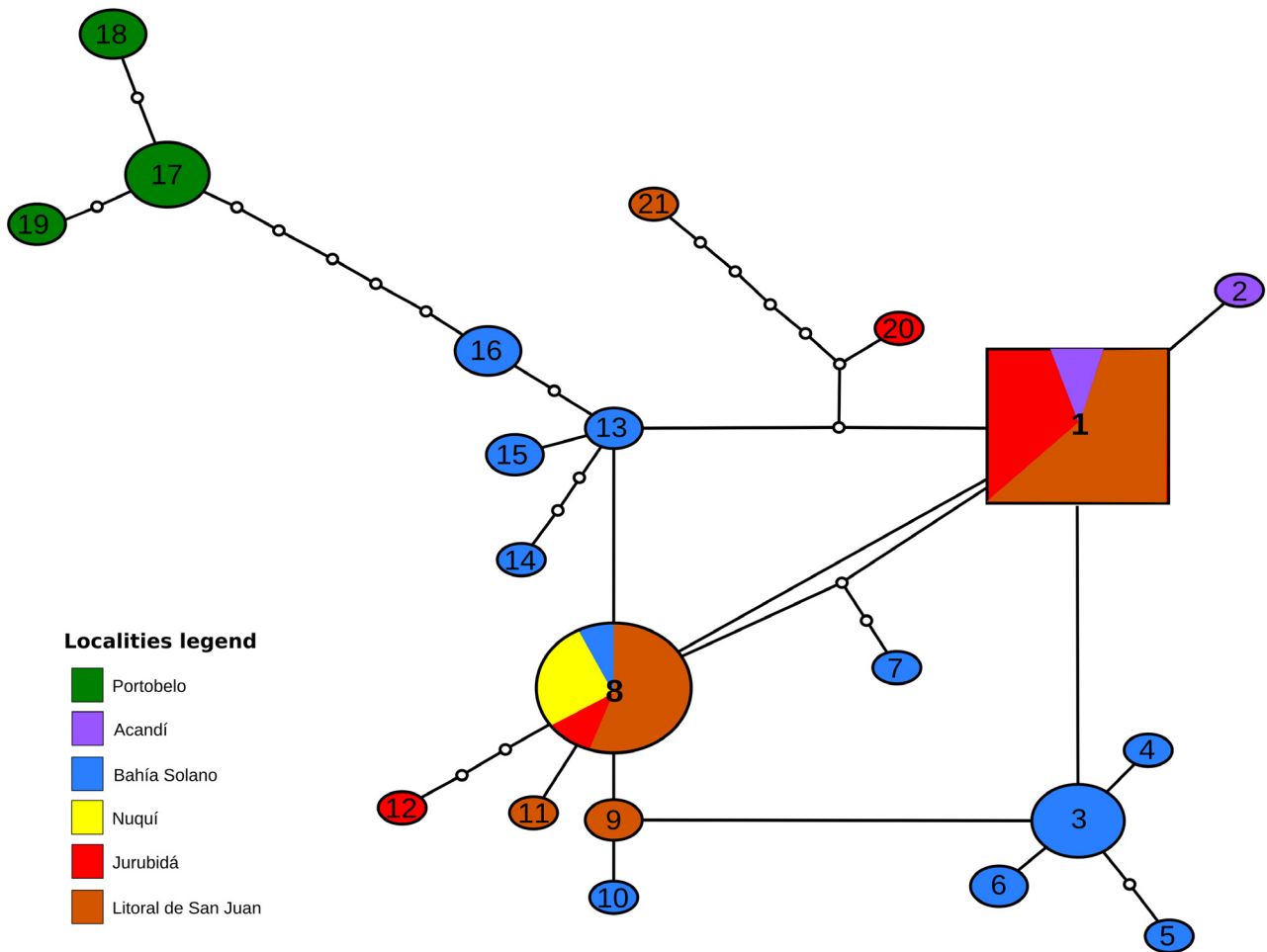


FIGURE 5. Haplotype network for *An. neivai* collected in Colombia and Panama (based on a 535 bp *COI* alignment).

With the relative ease in which *COI* barcode sequences are now produced and their unique specificity, the *COI* barcode region provides a means to evaluate the extensive geographic distribution of *An. neivai* and may be helpful in evaluating the existence of sibling or cryptic species from different environments and geographic regions (Hebert *et al.* 2003). Indications of morphological variation in *An. neivai* have been noted by Montoya-Lerma *et al.* (1987), and differences exceeding 3% in the *COI* barcode region have been reported by Linton (2009) among specimens from Colombia, Ecuador and Venezuela. This level of variability could indicate the presence of cryptic species, especially when compared to local distributions in Colombia and the species type locality. When comparing mutation rates of the same sequence region in *An. fluviatilis* James 1902, differences reached only 0.8 % including those between forms *S* and *T* (Kumar *et al.* 2013).

The presence of two highly frequent haplotypes (1 and 8), which differed by a single transition, among specimens from Colombia (Fig. 2) suggests they may represent hypothetical ancestors from which many of the other haplotypes were derived as was suggested for *An. pseudopunctipennis* Theobald, 1901 (Dantur Juri *et al.* 2014). Both of these haplotypes were most abundant at the southernmost Colombian municipality sampled, and while also present near the Panamanian border, they were not encountered at the type locality in Panamá. The minimal number of mutations between specimens of *An. neivai* from the type locality and those from Colombia was six. Based on a larger fragment of the *COI* gene, 978 bp, Mirabello & Conn (2006) found differences of seven mutational steps between specimens of *An. darlingi* from Central America and Colombia. Comparisons of haplotype divergence among *Kerteszia* species by Lorenz *et al.* (2015) detected a magnitude of difference between *An. cruzii* and *An. homunculus* of 23 mutations.

While *An. neivai* is primarily associated with low elevation coastal regions, several records of its presence at relatively high elevations occur in the literature including municipalities in the Colombian Departments of Antioquia, Cundinamarca, and Boyacá (González & Carrejo 2009; SEM 1957), the Venezuelan Andes (Rubio-

Palis 1991) and Ecuador (Arregui *et al.* 2015). The purported presence of *An. neivai* in atypical environments may be evaluated on the basis of barcode sequences. Such analyses would be appropriate for delimiting *An. neivai*'s distribution, from the perspectives of both elevation and geographic range, and also for detecting potential cryptic species. In turn, this knowledge should be beneficial for understanding *An. neivai*'s role in malaria transmission and for undertaking control measures.

Acknowledgements

Partial funding for this work was provided by the Amazon Malaria Initiative under the auspice of the US Agency for International Development (USAID). Special thanks are given to Robert A. Wirtz and Audrey Lenhart (both at the Centers for Disease Control and Prevention) for support throughout this endeavor. We are grateful for partial funding from Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) of the Universidad de Antioquia, COLCIENCIAS-COLFUTURO grant for PhD studies (Convocatoria 567) and also for logistic support from Fundación Salud para el Trópico, Santa Marta, Colombia. We also express our appreciation to Rafael Vivero, Diego Puerta and David Gallo (members of Grupo de Investigación en Sistemática Molecular - Universidad Nacional de Colombia sede Medellín and PECET) for their participation in the fieldwork. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3), 403–10.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Applied Biosystems. (2011) Sequence Scanner Software v1.0 Sequence Trace Viewer and Editor. Available from: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042188.pdf (accessed 1 July 2015)
- Arregui, G., Enríquez, S., Benítez-Ortiz, W. & Navarro, J.-C. (2015) Molecular Taxonomy of *Anopheles* from Ecuador, using mitochondrial DNA (Cytochrome c Oxidase I) and Maximum Parsimony optimization. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 55 (2), 128–136.
- Astaiza, R., Murillo, C. & Fajardo, P. (1988) Biología de *Anopheles (Kerteszia) neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. II Fluctuación de la población adulta. *Revista de Saúde Pública*, 22 (2), 101–108.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101988000200005>
- Brown, S.D.J., Collins, R.A., Boyer, S., Lefort, M.-C., Malumbres-Olarte, J., Vink, C.J. & Cruickshank, R.H. (2012) Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12, 562–565.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>
- Chaparro, P. & Padilla, J. (2012) Mortalidad por paludismo en Colombia, 1979–2008. *Biomédica*, 32 (Supplement 1), 95–105.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9 (10), 1657–1659.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Collins, F., Mendez, M., Rasmussen, M., Mehaffey, P., Besansky, N. & Finnerty, V. (1987) A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* Complex. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37 (1), 37–41.
- Collins, F.H. & Paskewitz, S.M. (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5 (1), 1–9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2583.1996.tb00034.x>
- Cywinska, A., Hunter, F.F. & Hebert, P.D.N. (2006) Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20 (4), 413–424.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x>
- Dantur Juri, M.J., Moreno, M., Prado Izaguirre, M.J., Navarro, J.-C., Zaidenberg, M.O., Almirón, W.R., Claps, G.L. & Conn, J.E. (2014) Demographic history and population structure of *Anopheles pseudopunctipennis* in Argentina based on the mitochondrial *COI* gene. *Parasites & Vectors*, 7 (1), 423.
<http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-423>
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*,

32 (5), 1792–1797.

<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>

- Escovar, J., González, R. & Quiñones, M.L. (2013) Anthropophilic biting behaviour of *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab associated with Fishermen's activities in a malaria-endemic area in the Colombian Pacific. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108 (8), 1057–1064.
<http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130256>
- Escovar, J., González, R., Quiñones, M.L., Wilkerson, R.C., Harrison, B. & Ruiz-lopez, F. (2012) Morphological and molecular identification of *Anopheles (Kerteszia)* present in two endemic foci of malaria in Colombia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28 (2), 106–107.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294–299.
- Foster, P.G., Bergo, E.S., Bourke, B.P., Oliveira, T.M.P., Nagaki, S.S., Sant'Ana, D.C. & Sallum, M.A.M. (2013) Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles (Nyssorhynchus)*. *Plos ONE*, 8 (2), e54063.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054063>
- Gómez, G., Jaramillo, L. & Correa, M.M. (2013) Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the Albitarsis Complex from Colombia. *Molecular Ecology Resources*, 2, 1082–1092.
<http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12126>
- González, R., Carrejo, N., Wilkerson, R.C., Alarcon, J., Alarcon-Ormasa, J., Ruiz, F., Bhatia, R., Loaiza, J. & Linton, Y.M. (2010) Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (8), 1001–1009.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000800009>
- González, R. & Carrejo, N. (2009) *Introducción al estudio taxonómico de Anopheles de Colombia: Claves y notas de distribución*. Programa Editorial Universidad del Valle, Cali. 260 pp.
- Gutiérrez, L., Orrego, L.M., Gómez, G.F., López, A., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2010) A new mtDNA COI gene lineage closely related to *Anopheles janconnae* of the Albitarsis complex in the Caribbean region of Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (8), 1019–1025.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000800011>
- Gutierrez, L.A., Gomez, G.F., Gonzalez, J.J., Castro, M.I., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2010) Microgeographic Genetic Variation of the Malaria Vector *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae) from Cordoba and Antioquia, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83 (1), 38–47.
<http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0381>
- Gutiérrez, L.A., Naranjo, N., Jaramillo, L.M., Muskus, C., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2008) Natural infectivity of *Anopheles* species from the Pacific and Atlantic Regions of Colombia. *Acta Tropica*, 107, 99–105.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.019>
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. & Hebert, P.D.N. (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 968–971.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510466103>
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harbach, R.E. (2013) The Phylogeny and classification of *Anopheles*. In: Manguin, S. (Ed), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. InTech, Rijeka, pp. 55.
- Harrison, B.A., Ruiz-Lopez, F., Falero, G.C., Savage, H.M., Pecor, J.E. & Wilkerson, R.C. (2012) *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*, 3218, 1–17.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., Jeremy, R. & DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 270 (1512), 313–321.
<http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. & Francis, C.M. (2004) Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, 2 (10), 1657–1663.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Setha, T., Min, S., Chang, M.S. & Walton, C. (2009) Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*, 10, 11.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-10-11>
- INS (Instituto Nacional de Salud). (2015) Boletín Epidemiológico Semanal. Estadísticas del sistema de vigilancia en salud pública- SIVIGILA. Available from: [http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn Epidemiologico/2015 Boletin epidemiologico Semana 52.pdf](http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiologico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2052.pdf) (accessed 10 January 2016)
- Jaramillo, L.M., Gutiérrez, L.A., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2011) Molecular evidence for a single taxon, *Anopheles nuneztovari* s.l., from two endemic malaria regions in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (8),

1017–23.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000800020>

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. (2012) Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12) 1647–1649.
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16 (2), 111–120.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kumar, N.P., Krishnamoorthy, N., Sahu, S.S., Rajavel, A.R., Sabesan, S. & Jambulingam, P. (2013) DNA Barcodes indicate members of the *Anopheles fluviatilis* (Diptera: Culicidae) species complex to be conspecific in India. *Molecular Ecology Resources*, 13 (3), 354–361.
<http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12076>
- Kumar, N.P., Rajavel, A.R., Natarajan, R. & Jambulingam, P. (2007) DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44 (1), 1–7.
[http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[1:DBCDSO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[1:DBCDSO]2.0.CO;2)
- Lehr, M.A., Kilpatrick, C.W., Wilkerson, R.C. & Conn, J.E. (2005) Cryptic species in the *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) complex: incongruence between random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction identification and analysis of mitochondrial DNA *COI* gene sequences. *Annals of the Entomological Society of America*, 98 (6), 908–917.
[http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746\(2005\)098\[0908:CSITAN\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0908:CSITAN]2.0.CO;2)
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11), 1451–1452.
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Linton, Y.-M.M. (2009) Mosquito Barcoding Initiative. The first barcode release paper. *Third International Barcode of Life Conference*. Available from: <https://vimeo.com/8996184> (accessed 11 September 2015)
- Lorenz, C., Patané, J.S.L. & Suesdek, L. (2015) Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 144–152.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.011>
- Mirabello, L. & Conn, J.E. (2006) Molecular population genetics of the malaria vector *Anopheles darlingi* in Central and South America. *Heredity*, 96, 1–11.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6800805>
- Montoya-Lerma, J., Murillo, C. & Solarte, Y. (1987) Variación fenotípica de *Anopheles (K) neivai* (Diptera: Culicidae) en la costa Pacífica de Colombia. *Colombia Médica*, 8 (1), 25–27.
- Murillo, C., Astaiza, R. & Fajardo, P. (1988) Biología de *Anopheles (Kerteszia) neivai* h., d. & k., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. I fluctuación de la población larval y características de sus criaderos. *Revista de Saúde Pública*, 22 (2), 94–100.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101988000200004>
- Oliveira, T.M.P., Foster, P.G., Bergo, E.S., Nagaki, S.S., Sanabani, S.S., Marinotti, O., Marinotti, P.N. & Sallum, M.A.M. (2016) Mitochondrial genomes of *Anopheles (Kerteszia)* (Diptera: Culicidae) from the Atlantic Forest, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 1–8. [published online]
- Park, D.-S., Suh, S.-J., Oh, H.-W. & Hebert, P.D.N. (2010) Recovery of the mitochondrial COI barcode region in diverse Hexapoda through tRNA-based primers. *BMC Genomics*, 11, 423.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-423>
- Paradis, E. (2012) *Analysis of Phylogenetics and Evolution with R*. Springer, New York, 386 pp.
- Pecor, J. & Gaffigan, T. (1997) Collecting, rearing, preserving, mounting and shipping techniques for mosquitoes. Available from: <http://wrbu.si.edu/Techniques.html> (accessed 12 August 2015)
- R Development Core Team (2015) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available from: <http://www.r-project.org> (accessed 5 October 2015)
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7 (3), 355–364.
- Rona, L.D.P., Carvalho-Pinto, C.J. de & Peixoto, A. (2012) Speciation in Brazilian Atlantic Forest mosquitoes: A mini-review of the *Anopheles cruzii* species complex. In: Fusté, C. (Ed.), *Studies in population genetics*. INTECH Open Access Publisher, Rijeka, pp. 105–116.
<http://dx.doi.org/10.5772/35693>
- Rona, L.D.P., Carvalho-Pinto, C.J., Gentile, C., Grisard, E.C. & Peixoto, A. (2009) Assessing the molecular divergence between *Anopheles (Kerteszia) cruzii* populations from Brazil using the timeless gene: further evidence of a species complex. *Malaria Journal*, 8, 60.
<http://dx.doi.org/10.1186%2F1475-2875-8-60>
- Rosa-Freitas, M.G., Lourenço-de-Oliveira, R., Carvalho-Pinto, C.J. de, Flores-Mendoza, C. & Silva-do-Nascimento, T.F.

- (1998) Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93 (5), 651–655.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000500016>
- Rosero, D.A., Jaramillo, L.M., Gutiérrez, L. a., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2012) Genetic diversity of *Anopheles triannulatus* s.l. (Diptera: Culicidae) from Northwestern and Southeastern Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87 (5), 910–920.
<http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0285>
- Rozo-Lopez, P. & Mengual, X. (2015) Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *ZooKeys*, 513, 39–64.
<http://dx.doi.org/10.3897/zookeys.513.9561>
- Rubio-Palis, Y. (1991) *Vector biology and malaria transmission in western Venezuela*. University of London, London, 261 pp.
- Ruiz-Lopez, F., Linton, Y.M., Ponsonby, D.J., Conn, J.E., Herrera, M., Quiñones, M.L., Vélez, I.D. & Wilkerson, R.C. (2010) Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105 (7), 899–903.
- Ruiz-Lopez, F., Wilkerson, R.C., Conn, J.E., McKeon, S.N., Levin, D.M., Quiñones, M.L., Póvoa, M.M. & Linton, Y.-M.M. (2012) DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the *Albitarsis* Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5 (1), 44.
<http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-44>
- SEM (Servicio de Erradicación de la Malaria. Ministerio de Salud Pública. República de Colombia) (1957) *Plan de erradicación de la Malaria en Colombia. Vol. II*. Ministerio. de Salud. Pública. Bogotá, 635 pp.
- Silva-do-Nascimento, T.F., Pitaluga, L.D.R., Peixoto, A.A. & Lourenço-de-Oliveira, R. (2011) Molecular divergence in the *timeless* and *cpr* genes among three sympatric cryptic species of the *Anopheles triannulatus* complex. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 (Supplement 1), 218–22.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000900027>
- Sinka, M.E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Van Boeckel, T., Kabaria, C.W., Harbach, R.E. & Hay, S.I. (2010) The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*, 3 (4), 72.
<http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-3-72>
- Stone, A., Knight, K.L. & Starcke, H. (1959) *A Synoptic Catalog of the mosquitoes of the World (Diptera: Culicidae)*. The Thomas Say Foundation, Entomological Society of America, Washington D.C., 358 pp.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725–2729.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Uribe, S.I., Lehmann, T., Rowton, E.D., Vélez B., I.D. & Porter, C.H. (2001) Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial ND4 gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18 (1), 84–93.
<http://dx.doi.org/10.1006/mpev.2000.0863>
- Uribe, S.I., Porter, C.H. & Vélez, I.D. (1998) Amplificación y obtención de secuencias de rRNA mitocondrial en *Lutzomyia spp* (Diptera: Psychodidae) vectores de Leishmaniosis. *Revista Colombiana de Entomología*, 23 (3–4), 177–185.
- Zavortink, T.J. (1973) Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 9 (3), 1–54.



Research paper

Intraspecific phylogeny of *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab 1913, based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes

Andrés López-Rubio^{a,*,1}, Juan David Suaza-Vasco^{a,1}, Sergio Solari^{b,1}, Lina Gutiérrez-Builes^{c,1}, Charles Porter^{a,1}, Sandra I. Uribe^{a,1}

^a Universidad Nacional de Colombia – Medellín, Facultad de Ciencias – Escuela de Biociencias, Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Carrera 65 59A-110, Medellín 050034, Colombia

^b Instituto de Biología, Grupo de Mastozoología, Universidad de Antioquia, Calle 70 52-21, Medellín, Colombia

^c Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Grupo de Biología de Sistemas, Universidad Pontificia Bolivariana, Calle 78B 72A-109, Medellín, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:

Malaria
COI
Cytb
D2
Cryptic species

ABSTRACT

Three mitochondrial regions and a fragment of a large nuclear ribosomal subunit was used to study the evolutionary patterns of *An. neivai*, a mosquito inhabiting mangroves and tropical forest in the lowland and coastal areas of the Yucatan Peninsula through the Pacific Ecuadorian coast. This species exhibits epidemiological importance regarding Malaria transmission in natural ecosystems, particularly in rural areas of the Pacific Colombian coast. The results based on phylogenetic networks and Bayesian inference showed no robust evidence supporting the existence of previously suggested cryptic species. Diversification patterns in geographically widespread species such as this one, are complex and therefore could impact malaria control strategies. Further studies focused on behavior, morphology, and phylogenomics will improve the understanding of the evolutionary patterns within *An. neivai* and its role as a disease vector.

1. Introduction

Anopheles (Kerteszia) neivai Howard Dyar & Knab, 1913 (Diptera: Culicidae) is widely distributed from the Yucatan Peninsula in Mexico through the northern pacific coast in Ecuador, inhabiting lowland tropical forests and mangroves in coastal areas (Forattini, 2002; Knight and Stone, 1977; Zavortink, 1973). Epidemiological evidence indicates *An. neivai* serves as a vector for malaria in the Colombian Pacific Coast in several localities such as Charambirá, Santa Bárbara–Iscuandé, and Buenaventura (Escovar et al., 2013; Murillo et al., 1988; Olano et al., 1997).

Despite the reports of primary vectors for this area such as *An. darlingi*, and *An. albimanus* (Montoya-Lerma et al., 2011), the available epidemiological data from *An. neivai* and other secondary culicid vectors suggest these species of mosquitoes should be considered as important vectors for disease within their local range (Sinka et al., 2010). In this context, and for malaria-control purposes, a precise taxonomical identification and knowledge of the vector species is essential (Higa et al., 2010; Müller et al., 2013). There are several sections within the *Anopheles* genus where cryptic species –two or more distinct species classified as a single species– are recognized, thus contributing to the

difficulty of proper taxonomic assignment and appropriate control activities (Bickford et al., 2007; Collins and Paskewitz, 1996; Rosa-Freitas et al., 1998). Moreover, the vectorial capacity for transmission of *Plasmodium* spp. may vary across different cryptic species of *Anopheles* and therefore a robust taxonomic assessment of the genus is critical for malaria control efforts (Stevenson and Norris, 2017).

Studying the evolutionary patterns in suspected cryptic species can help to identify recently diverged species within a species complex (Bourke et al., 2013). Nowadays, molecular markers are widely used to examine evolutionary patterns and to reconstruct phylogenies in anopheline mosquitoes at several systematic scales, including intraspecific phylogenies (Moreno et al., 2013; Wilkerson et al., 2005). The purpose of constructing a multilocus phylogeny is to merge all available data sources in order to provide a more robust assessment of species limits. Several strategies for analyzing multilocus datasets exist including matrix concatenation, total evidence, and more recently used, a species tree (Igea et al., 2015; Schlick-Steiner et al., 2010; Yeates et al., 2011).

Regarding tropical anophelines, multilocus phylogenies improved the understanding of the evolutionary patterns in *An. triannulatus*, a vector of malaria in Brazil, with epidemiological importance in Peru and Venezuela. Phylogenetic analyses using mitochondrial COI, nuclear

* Corresponding author.

E-mail address: andreslop27@gmail.com (A. López-Rubio).

¹ These authors contributed equally to this work.

Table 1
Collection Information for sampled localities.

Country	Location	Species (sample number)	Latitude	Longitude	Altitude (masl ^a)
Brazil	Capanema (CAP)	<i>Anopheles marajoara</i> (1)	1°11' 45.62" S	47°9' 41.50" W	31
Colombia	Sierra Nevada de Santa Marta (MAG)	<i>An. pholidotus</i> (1)	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	1689
	Acandí (ACA)	<i>An. neivai</i> (2)	8° 34' 39.81" N	77° 23' 56.31" W	200
	Bahía Solano (BAH)	<i>An. neivai</i> (6)	6° 21' 40.81" N	77° 21' 23.89" W	32
	Nuquí (NUQ)	<i>An. neivai</i> (8)	5° 41' 24.1" N	77° 15' 16.7" W	26
	Litoral de San Juan (LIT)	<i>An. neivai</i> (5)	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	8
Panama	Portobelo (POR)	<i>An. neivai</i> (6)	9° 29' 59.4" N	79° 41' 30.96" W	16
Guatemala	Puerto Barrios (PUE)	<i>An. neivai</i> (4)	15° 40' 23.34" N	88° 41' 27.96" W	912
	Chiquimula (CHI)	<i>An. neivai</i> (4)	14° 50' 48.60" N	89° 40' 36" W	1743

^a Meters above sea level.

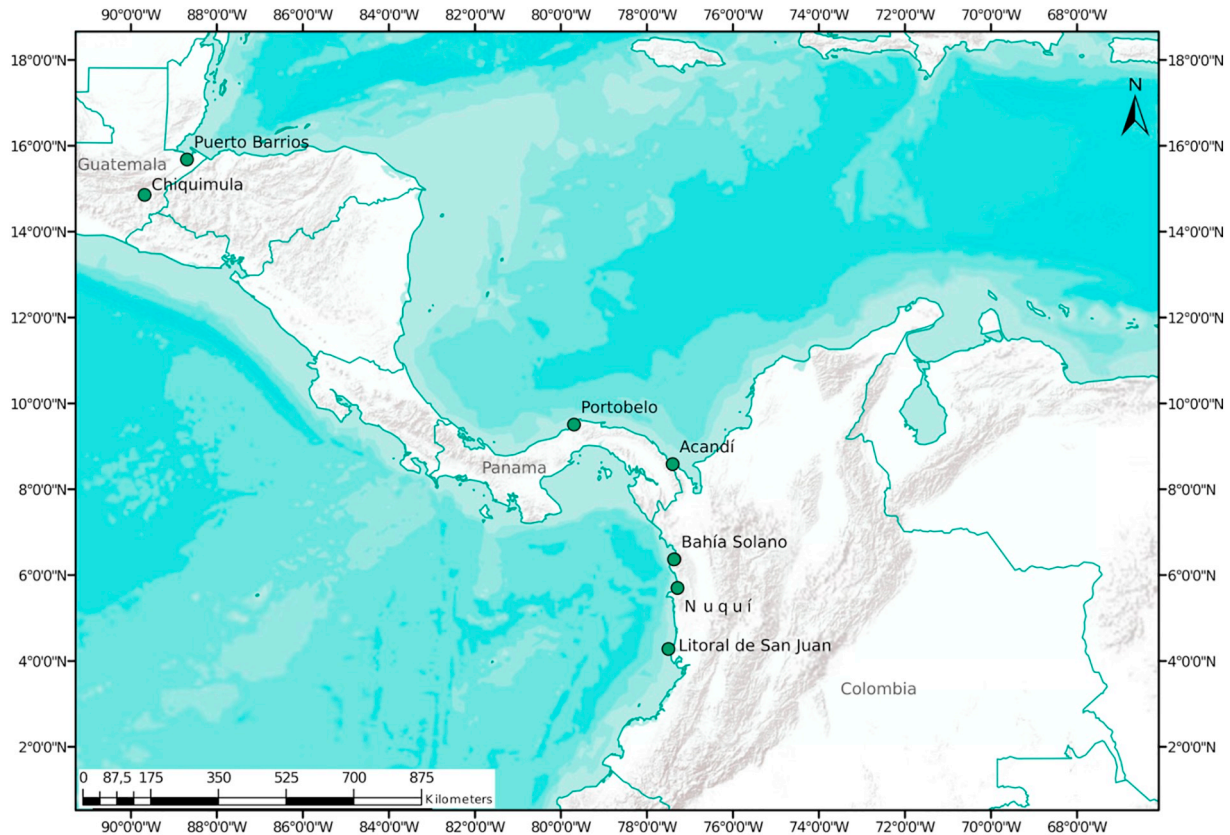


Fig. 1. Collection map for specimens in Colombia, Panama and Guatemala.

ITS2 and *White* DNA sequences revealed two major and well-differentiated groups corresponding to specimens collected from the Amazon and Andean regions (Moreno et al., 2013). In addition, the use of three circadian clock genes and three encoding ribosomal proteins in *An. cruzii*, considered as a secondary malaria vector at the Brazilian Atlantic forest, showed the existence of sibling or incipient species (Rona et al., 2012). In all these studies, the use of multilocus phylogenies were used to identify the smallest diagnosable cluster of individuals, according to the phylogenetic species concept (De Queiroz, 1998).

An. neivai, within the subgenus *Kerteszia*, is proposed as a species complex based on morphological, behavioral, and genetic data including spot scale color and pattern variations in the R₄₊₅ vein (Montoya-Lerma et al., 1987), biting activity, and variability in the DNA *COI* barcoding region (Linton, 2009). In particular, the available DNA barcode genetic data suggested at least three different genetic groups for specimens distributed across Guatemala, Colombia, Venezuela and Ecuador (Ahumada et al., 2016; Suaza et al., 2009). However, the evolutionary patterns in *An. neivai*, including topotypic specimens have not been explored.

In the present study, the evolutionary patterns of *An. neivai* in three mitochondrial regions and a ribosomal gene fragment were explored to determine the presence of possible cryptic species, using total-evidence and taxonomic congruence approaches.

2. Materials and methods

Specimens of *An. neivai* were collected from seven locations in South and Central America (Table 1), including the type locality at Portobelo (Panama) (Fig. 1). Adult specimens were collected with Shannon and CDC traps, while immatures (larvae and pupa) were collected in bromeliads and reared under laboratory conditions to collect exuviae as a source of morphological evidence and species confirmation. Morphological identifications were based on the taxonomic keys for adult and immature specimens from (Escovar et al., 2012; González and Carrejo, 2009). In addition, other species from *Kerteszia* (*An. pholidotus*) were included along with specimens from *Nyssorhynchus* (*An. braziliensis* and *An. marajoara*), as this taxon is the recognized sister group of *Kerteszia* (Harbach, 2013, 2007; Sallum et al., 2002). All voucher specimens were

Table 2
Primer sequence and thermal profile used for PCR and cycle sequencing experiments.

Molecular region/ primers	PCR annealing temperature/time
<i>COI</i> (Kumar et al., 2007)/Kum07-F (GGATTGGAAAT-GATTAGTTCCTT) Kum07-R (AAAAATTTTAATTCAGTTGGAACAGC)	48–51 °C/ 60s
<i>ND4</i> (Gorochotegui-Escalante et al., 2000)/ND4+ (GTDYATTATGATTRCCTAA) ND4- (CTTCGDCTTCWADWCGTTC)	48 °C/36s
<i>Cytb-TRNASer-IG1-ND1</i> (Ready et al., 1997)/CB3FC (CAYATCAACCWGAATGATA) NINFR GGTAYWTTGCCTCGAWTTCGWTATGA)	47 °C/30s
<i>D1–D2</i> (Porter and Collins, 1996)/ CP12 (GTGGATCCAGTCGTGTGCTTGATAGTGACG) CP15 (GTGAATTCCTGGTCCGTGTTCAAGACGGG)	62 °C/34.8s

deposited at the Francisco Luís Gallego Entomological Museum (MEFLG), National University of Colombia, Medellín. Field permit for collecting trips were authorized under decree 1376, June 27th 2013, Ministerio de Medio Ambiente, República de Colombia, collecting permits for Guatemala and Panama were obtained through USDA importation and transit of vectors permit issued to the Centers for Disease Control and Prevention and collecting permit issued to Gorgas Institute for Health Research respectively (available upon request).

For DNA extraction purposes, two legs on each adult specimen were removed as well as abdominal segments for those in larval stage. The DNA extraction procedure was performed using the macerate buffer protocol for insects (Collins et al., 1987; Uribe et al., 1998). Subsequent Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplifying Cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) corresponding to the DNA *COI* barcoding region, NADH dehydrogenase subunit 4 (*ND4*), a fragment between Cytochrome b and NADH dehydrogenase subunit 1 (*Cytb-tRNASer-IG1-ND1*) and two variable regions from the 28S ribosomal RNA (*D1–D2 loops*) were performed separately using 33 µL molecular grade H₂O; 5 µL Buffer 10×; 2.5 µL dntp [5 mM]; 3 µL MgCl₂ [50 mM]; 1 µL [10 mM] for each primer set and 0.3 µL of Taq Bioline® (London, United Kingdom). Primer sequences and their respective thermal profiles are provided in Table 2. All PCR products were evaluated using agarose gel electrophoresis (Lonza Gelstar®; Basel, Switzerland). For the successful products, subsequent purification was performed on a Millipore multiscreen HTS vacuum Manifold® (Billerica, USA).

DNA sequencing reaction was performed for each region, using the

primers described in Table 2 with the following conditions: 0.5 µL [10 mM] of primer, 2 µL of purified PCR product, 4.5 µL molecular grade H₂O, 2 µL ABI® 5× sequencing buffer, 0.5 µL Applied Biosystems BigDye Terminator® V1.1 (Waltham, USA). The thermal conditions for cycle sequencing were as follows: 96 °C/ 60 s (denature), 50 °C/4 s (anneal), and 60 °C/120 s (extension), for 25 cycles. For the purification of cycle sequencing products, removal of salt excess and unincorporated terminators, we used Applied Biosystems BigDye Xterminator® (Waltham, USA). All purified products, were analyzed in an Applied Biosystems ABI 3500XL® capillary electrophoresis sequencer (Waltham, USA) at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA.

Raw chromatograms, were analyzed in terms of quality estimators such as the Continuous Read Length CRL (CRL) and Quality Value over 20 (Qv20+), using Applied Biosystems Sequence Scanner 1.0 (Waltham, USA). The resulting DNA consensus sequences from high quality chromatograms were built using the CAP 3 assembly program (Huang and Madan, 1999) available in Geneious® 9 (Kearse et al., 2012). A Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was performed for each sequence to verify positional homology for the sequenced regions. The absence of nuclear mitochondrial DNA segments (NUMT) (Lopez et al., 1994) were verified following previously published procedures (Hlaing et al., 2009). Searches for publicly available *An. neivai* *COI* sequences were performed using GenBank (Benson et al., 2013) and the barcoding of Life Database (BOLD) (Ratnasingham and Hebert, 2007). These sequences were used as a complementary tool for the taxonomic

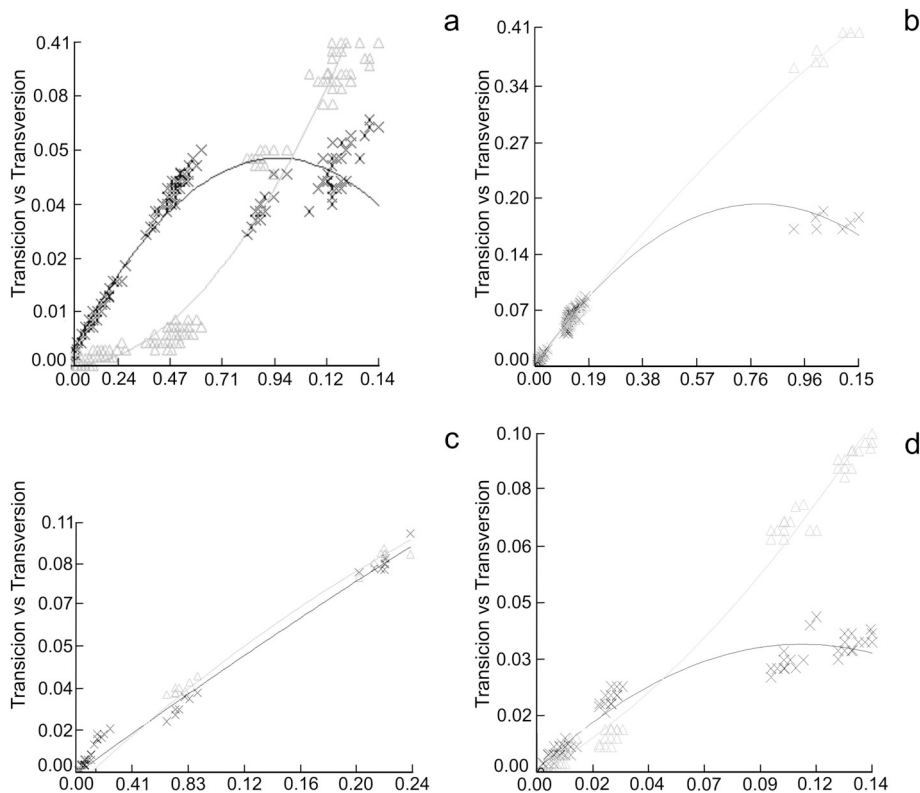


Fig. 2. Transition (Xs) vs. Transversion (▲v) rates over a distance (K80) among mitochondrial and nuclear ribosomal regions. a) *COI*, b) *ND4*, c) *D1–D2*, d) *Cytb-TRNASer-IG1-ND1*.

Table 3
Congruence values from distance matrices (CADM) for *COI*, *D1–D2*, *Cytb–tRNASer–IG1–ND1* and *ND4* regions.

Region	CADM ^a (W) ^b
<i>COI</i> , <i>Cytb–tRNASer–IG1–ND1</i>	0.921
<i>COI</i> , <i>D1–D2</i>	0.886
<i>D1–D2</i> , <i>Cytb–tRNASer–IG1–ND1</i>	0.851
<i>COI</i> , <i>D1–D2</i> , <i>Cytb–tRNASer–IG1–ND1</i>	0.848
<i>Cytb–tRNASer–IG1–ND1</i> , <i>ND4</i>	0.653
<i>COI</i> , <i>Cytb–tRNASer–IG1–ND1</i> , <i>ND4</i>	0.649
<i>COI</i> , <i>D1–D2</i> , <i>ND4</i> , <i>Cytb–tRNASer–IG1–ND1</i>	0.648
<i>D1–D2</i> , <i>ND4</i>	0.646
<i>COI</i> , <i>ND4</i>	0.636
<i>COI</i> , <i>D1–D2</i> , <i>ND4</i>	0.630
<i>D1–D2</i> , <i>Cytb–tRNASer–IG1–ND1</i> , <i>ND4</i>	0.621

^a Statistical hypothesis for CADM

H_0 : Distance matrix is not congruent among regions.

H_1 : Distance matrices are congruent among regions.

^b Kendall's concordance estimator (Kendall and Smith, 1939; Legendre, 2005).

identification of the specimens collected herein.

The phylogenetic signal for each region was evaluated based on the substitution saturation index (Xia et al., 2003), and the transition/transversion divergence plot based on the Kimura distance model (Kimura, 1980), available in DAMBE 6 (Xia, 2017). Prior to concatenation, a set of congruence tests were implemented to provide statistical support for all possible combinations of markers, including the Incongruence Length Difference (ILD) test (Farris et al., 1994) implemented in the HOMPART command with an heuristic search and 560 homogeneity replications in PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2003), the Likelihood Ratio Test (LRT) (Huelsenbeck and Bull, 1996) with 100 bootstrap replicates in Concaterpillar 1.7 (Leigh et al., 2008), and the Congruence Among Distance Matrices (CADM) (Legendre and Lapointe,

2004) test implemented in R (R Development Core Team, 2015) using the APE package (Paradis et al., 2004) and the Kimura distance model (Kimura, 1980). We examined the molecular model of evolution for each of the selected regions from the concatenated matrix using JModeltest 2 (Darrriba et al., 2012). We explored three analyses to estimate the intraspecific phylogeny. First, a phylogenetic network was calculated using Splitstree 4 (Huson and Bryant, 2006) and the Neighbor-Net method (Bryant and Moulton, 2004) with Maximum Likelihood based distances (Schmidt et al., 2002). Subsequently, a Bayesian Inference approach was used for a molecular clock under the Yule speciation model hypothesis (Aldous, 2001; Yule, 1925), and a multilocus species tree approach under coalescence (Heled and Drummond, 2010), both estimated using BEAST 2 (Bouckaert et al., 2014). In addition, the estimation for each separate region used the same criteria for the network approach and the Bayesian inference as above.

3. Results

A total of 35 specimens of *An. neivai*, one *An. marajoara* and one *An. pholidotus* were studied using three molecular regions. *COI* exhibited a length of 596 bp fragment with 65 polymorphic sites, supporting the existence of 17 haplotypes. For the other mitochondrial regions such as *Cytb–tRNASer–IG1–ND1*, 12 polymorphic sites were found, with 15 haplotypes in a 415 bp fragment. In the *ND4* region, there were 58 polymorphic sites within a 357 bp fragment, with 13 haplotypes. In contrast, the *D1–D2* nuclear ribosomal gene fragment, consisted of a 469 bp with 11 polymorphic sites and seven haplotypes. In terms of transition and transversion rates over genetic distances, *ND4* exhibited higher substitution rates when compared to *COI*, *Cytb–tRNASer–IG1–ND1* and *D1–D2*, which showed the lower rates among all regions (Fig. 2). Accession records for each sequence are available in Table S1.

Comparison of the newly sequenced specimens to available *COI* records from GenBank, resulted in the identification of a single cluster

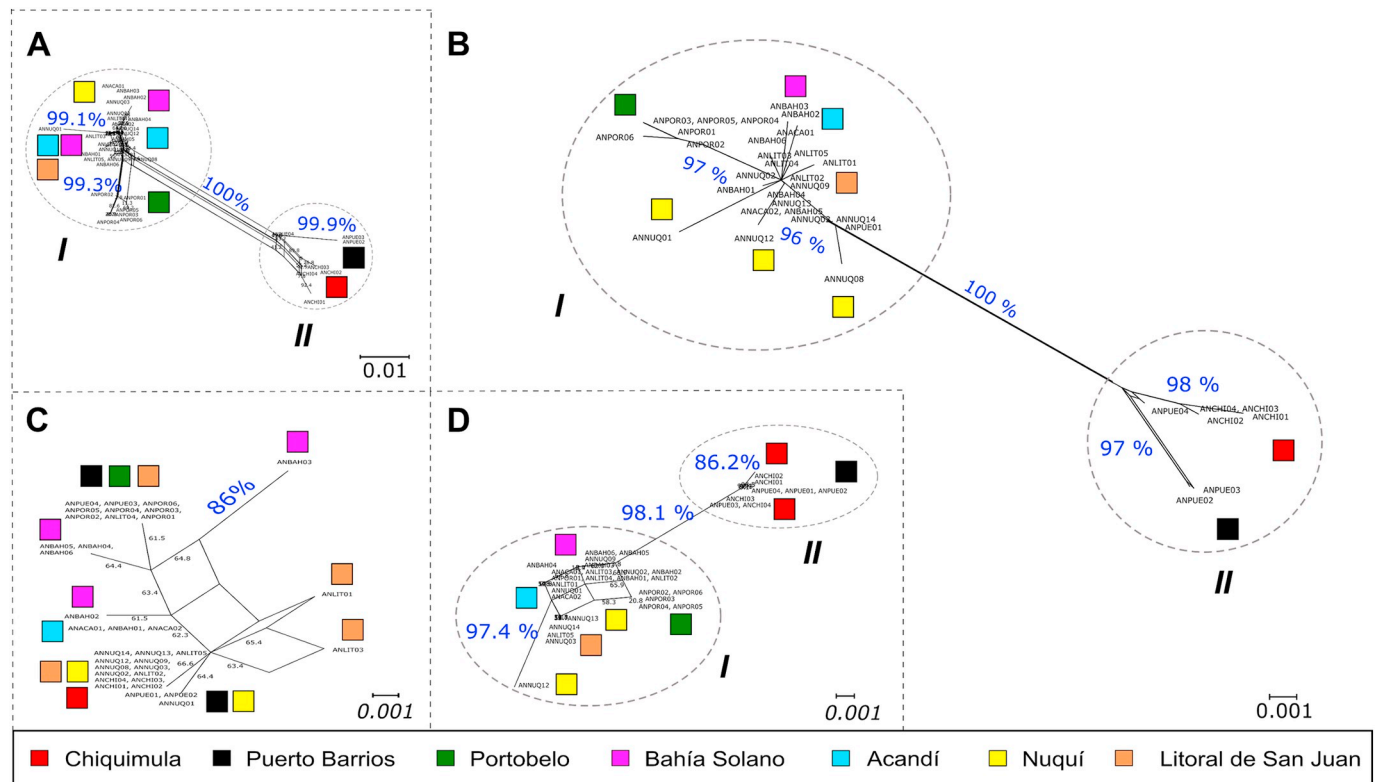


Fig. 3. Phylogenetic network (1000 bootstrap replicates and 95% credibility) for *COI* (A), *Cytb–tRNASer–IG1–ND1* (B) *D1–D2* (C) and the concatenation of *COI*, *Cytb–tRNASer–IG1–ND1*, *D1–D2* (D).

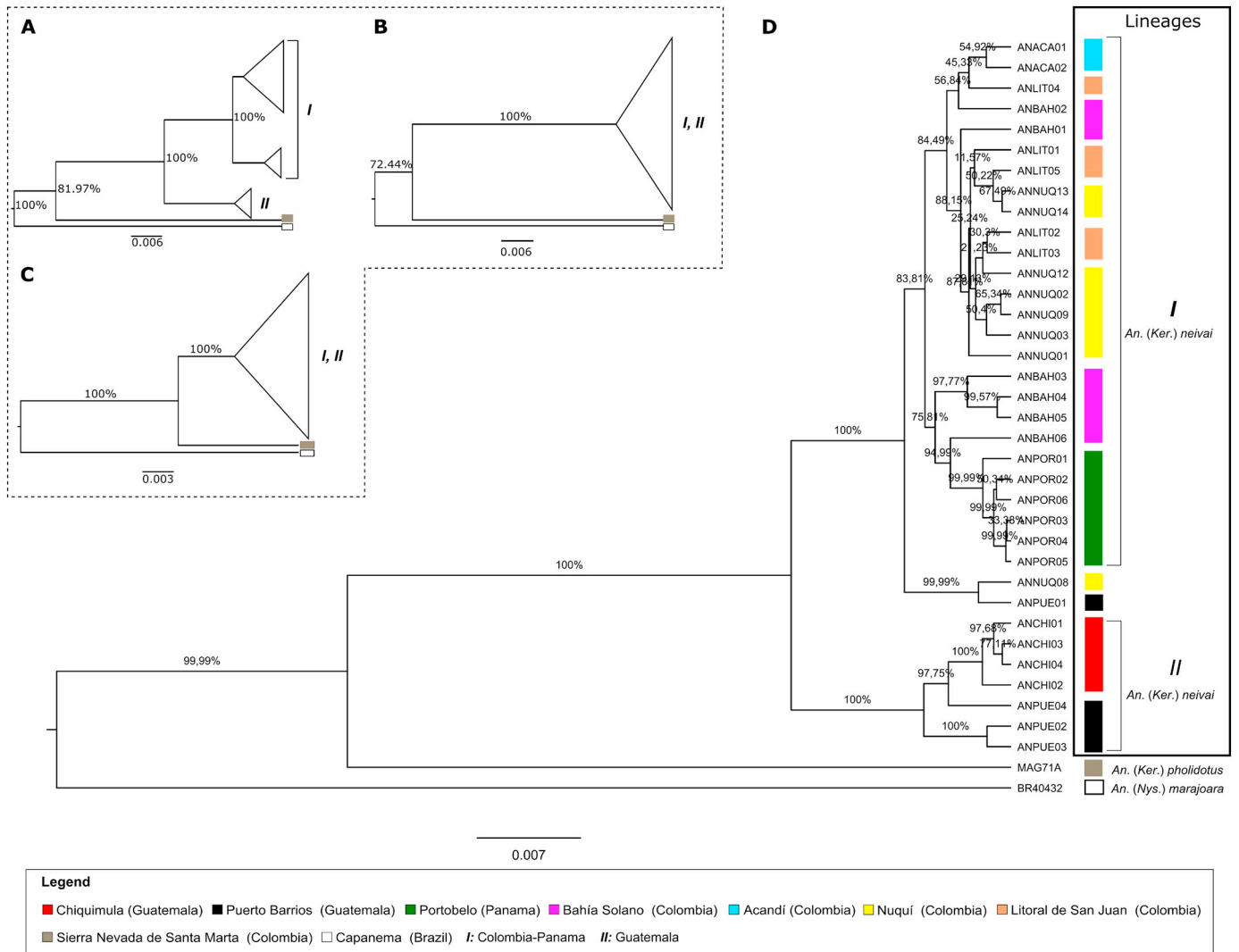


Fig. 4. Bayesian inference tree using Yule speciation model for *COI* (A), *Cytb-tRNAser-IG1-ND1* (B), *D1-D2* (C) in separate and concatenated analysis (D).

comprised of sequences generated from topotypic specimens collected in Portobelo (Panama), with small sub clusters in northern (Guatemala) and southern locations (Buenaventura) (S1 Fig).

Based on the polymorphic sites and the statistical parameter of each test, CADM was chosen over the remaining tests based on its reported accuracy on type I errors and robustness (Campbell et al., 2011) (S2 table). The final concatenated dataset consisted of at least two mitochondrial regions and the ribosomal *D1-D2* fragment, with a resulting concatenation for the *COI*, *Cytb-tRNAser-IG1-ND1* and *D1-D2* alignment. (Table 3).

The initial phylogenetic network revealed two statistically supported groups: Colombia-Panama (group I) and Guatemala (group II), with several local variants for Colombia (Fig. 3B). This topology was also identified in network analyses based on *COI* and *D1-D2* (Fig. 3A, C, D). Similarly, the resulting trees for *COI*, *Cytb-tRNAser-IG1-ND1* and *D1-D2* using Bayesian inference (Fig. 4C), showed agreement with the topologies from the phylogenetic network and a Bayesian tree inferred from *COI* sequence data (S2 Fig); in contrast, there was disagreement from the concatenated set with topologies from *Cytb-tRNAser-IG1-ND1* and *D1-D2* (S3 and S4 Fig). Furthermore, the intra-specific clades in the concatenated set tree showed weak support for the specimens in the Colombian localities (below 90%), with no relation from these inner groups to a geographical distribution, except for specimens collected at the locations in Panama and Guatemala. Despite these results and based on the general topology from the concatenated Bayesian tree (Fig. 4), a

scenario for the existence of two possible entities *An. neivai* s.s, and *An. neivai* A, tested by estimating a maximum credibility clade tree, which revealed strong support only for the entire *An. neivai* (100% support) clade, and low support for the grouping of three inner entities in *An. neivai* A (only 86.72% support) (Fig. 5).

4. Discussion

Phylogenetic studies are migrating from single gene to multilocus analyses (Yoshida et al., 2017) and this shift is accompanied by specific advantages, including more accurate assessments of species boundaries and increased resolution of phylogenetic relationships using probabilistic methods. Moreover, such methods also have the potential to elucidate speciation processes through the availability of more accurate species trees rather than those inferred from single genes (Kubatko et al., 2011). However, some drawbacks such as inconsistencies between gene and species trees become problematic when studying closely related species with large distributions or populations (Heled and Drummond, 2010). There is also evidence of differences in mutation rate patterns between nuclear and mitochondrial DNA (mito-nuclear discordance) which can lead to inaccurate hypotheses (Denton et al., 2014).

The evolution of genes at the intraspecific level cannot be appropriately represented based only on bifurcating trees, because relationships among individuals from the same species are not hierarchical as in

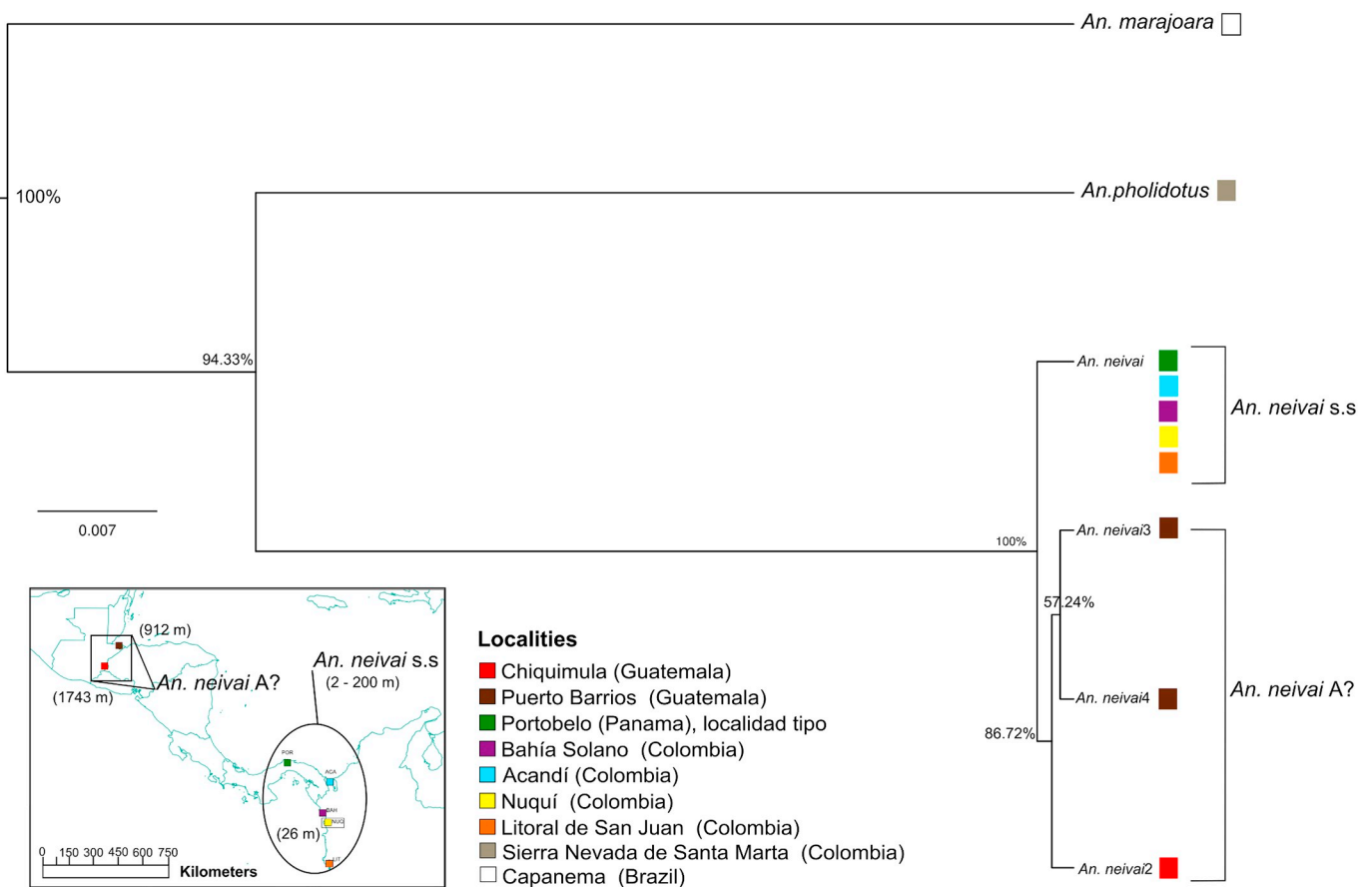


Fig. 5. Maximum credibility clad for possible cryptic species in *An. neivai* based in a coalescence multilocus approach.

traditional phylogeny, in this sense, phylogenetic networks offer more robust information (Posada and Crandall, 2001). For cryptic species, the discontinuity in genetic variability and reduced to non-existent gene flow among populations, is indicative of species level separation, represented in a network topology as separate segments or subnetworks (Ahmed et al., 2012). For example, in anophelines the use of parsimony networks based on a *COI* fragment in *An. minimus* revealed lack of connectivity among haplotypes as consequence of the existence of two lineages, suggesting the presence of cryptic species (Chen et al., 2011).

Our results from a neighbor-net topology, based on concatenation of two mitochondrial regions and a nuclear ribosomal gene fragment, showed overall topological agreement. From this topology, the specimens from Guatemala, Panama and Colombia were part of the same entity: *An. neivai*. The presence of reticulate vertex patterns in networks from separate analyses in *Cytb-tRNA^{Ser}-IG1-ND1* (Fig. 3B) and *D1-D2* (Fig. 3C) suggests high variability at the sampled locations. In addition, the loops –represented as squares inside the networks –found on individual neighbor and concatenated net topologies (Fig. 3C, D), as result of including *D1-D2*, suggest of possible recombination events or reverse mutations (Posada and Crandall, 2001). Previous studies on the phylogeny of Anopheles, showed the 28S large ribosomal subunit to exhibit lower mutation rates when compared to mitochondrial genes (Krzywinski et al., 2001). Despite these rates, the differences found in *D1-D2* sequences, were quite informative at species level for *An. neivai*.

Recent developments in mathematical modelling offer the alternative of estimating multispecies in coalescent trees. In this model, no horizontal gene transfer, admixture from different species, and orthologous genes is assumed, hence the topology from a species tree define barriers for gene flow, which can represent species at a taxonomical rank (Heled and Drummond, 2010)

Differences in topologies from the Bayesian gene trees under the

Yule speciation model, were evident as a consequence of different mutation rates, even among mitochondrial regions (Figs. 1,4A, B). On the other hand, the concatenated gene tree (Fig. 4C) and the multilocus species tree (Fig. 5) showed an overall topological agreement with the concatenated network topology (Fig. 3C), suggesting the same two lineages: Colombia-Panamá (*I*) and Guatemala (*II*) for the majority of specimens examined. In addition, the support values below 95% from maximum credibility clad in the multilocus species tree for lineage *II*, suggests these represent a single entity: *An. neivai*.

5. Conclusion

Despite of local scale variability and different evolutionary rates from examined mitochondrial and nuclear regions, the results from the Bayesian multilocus species tree under coalescence support the existence of a single entity: *An. neivai*. Inferring the intraspecific history of this vector is important for a better understanding of the biology of the species and its future impact on vector control purposes, in special at the Colombian Pacific coast due to its epidemiological importance.

6. Final recommendation

Further integrative taxonomy studies including environmental factor such as precipitation, relative humidity, organic matter, and air precipitation in bromeliad tanks over vector population dynamics; and also studies involving, behavior, immature morphology and phylogenomics in *An. neivai* and relationships with other species from *Kerteszia*, will provide new insights of the evolution patterns in *An. neivai* and perhaps elucidate cryptic species with implications in disease transmission.

Funding resources

We would like to thank COLCIENCIAS (567-Ph. D grant), Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Universidad de Antioquia, CODI (contract E01551) and the Amazon Malaria Initiative (AMI) for funding collecting surveys, reagents and equipment employed in this research.

Acknowledgments

Special thanks to Lorenzo Cáceres at the Gorgas Institute for Health Research for his cooperation and assistance during the collecting trips to Panama, Jovany Barajas at PECET, Universidad de Antioquia - for his assistance in field collecting trips; to Diego Puerta, Natalia Molina, and people at the Grupo de Investigación en Sistemática Molecular for their support with specimen processing, rearing experiments, and computing equipment for bioinformatics analysis; to Dr. P. A. Larsen (Duke University) and Matthew Tabakman for useful comments and suggestions to a previous draft; also to Drs. Paula Marcet, Robert Wirtz, Claudia Corredor and Audrey Lenhart at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) for their invaluable help on trip collections and assistance in DNA sequencing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.013>.

References

- Ahmed, M.Z., De Barro, P.J., Olleka, A., Ren, S.X., Mandour, N.S., Greeff, J.M., Qiu, B.L., 2012. Use of consensus sequences and genetic networks to identify members of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex in Egypt and Syria. *J. Appl. Entomol.* 136, 510–519.
- Ahumada, M.L., Orjuela, L.I., Pareja, P.X., Conde, M., Cabarcas, D.M., Cubillos, E.F.G., Lopez, J.A., Beier, J.C., Herrera, S., Quiñones, M.L., 2016. Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malar. J.* 15, 407.
- Aldous, D.D.J.D.J., 2001. Stochastic models and descriptive statistics for phylogenetic trees, from Yule to today. *Stat. Sci.* 16, 23–34.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W., 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41, D36–D42.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L.L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K.K., Das, I., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* 22, 148–155.
- Bouckaert, R.R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A.J., 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003537.
- Bourke, B.P., Oliveira, T.P., Sueddek, L., Bergo, E.S., Sallum, M.A.M., 2013. A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors* 6, 111.
- Bryant, D., Moulton, V., 2004. Neighbor-net: an Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Mol. Biol. Evol.* 21, 255–265.
- Campbell, V., Legendre, P., Lapointe, F.-J., 2011. The performance of the Congruence among Distance Matrices (CADM) test in phylogenetic analysis. *BMC Evol. Biol.* 11, 64.
- Chen, B., Pedro, P.M., Harbach, R.E., Somboon, P., Walton, C., Butlin, R.K., 2011. Mitochondrial DNA variation in the malaria vector *Anopheles minimus* across China, Thailand and Vietnam: evolutionary hypothesis, population structure and population history. *Heredity (Edinb.)* 106, 241–252.
- Collins, F.H., Paskewitz, S.M., 1996. A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.* 5, 1–9.
- Collins, F., Mendez, M., Rasmussen, M., Mehaffey, P., Besansky, N., Finnerty, V., 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 37–41.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772.
- De Queiroz, K., 1998. The General Lineage Concept of Species, Species Criteria, and the Process of Speciation and Terminological Recommendations. *Endless Forms Species Speciat.* pp. 57–75.
- Denton, R.D., Kenyon, L.J., Greenwald, K.R., Gibbs, H.L., 2014. Evolutionary basis of mitonuclear discordance between sister species of mole salamanders (*Ambystoma* sp.). *Mol. Ecol.* 23, 2811–2824.
- Escovar, J., González, R., Quiñones, M.L., Wilkerson, R.C., Harrison, B., Ruiz-Lopez, F., 2012. Morphological and molecular identification of *Anopheles (Kerteszia)* present in two endemic foci of malaria in Colombia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 28, 106–107.
- Escovar, J., González, R., Quiñones, M.L., 2013. Anthropophilic biting behaviour of *Anopheles (Kerteszia) neivai* Howard, Dyar & Knab associated with Fishermen's activities in a malaria-endemic area in the Colombian Pacific. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 1057–1064.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10, 315–319.
- Forattini, O., 2002. *Culicidologia Médica* Vol. 2. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- González, R., Carrejo, N., 2009. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: Claves y notas de distribución. Colección Libros de investigación. Programa Editorial Universidad del Valle, Cali.
- Gorochotegui-Escalante, N., De Lourdes Munoz, M., Fernandez-Salas, I., Beatty, B.J., Black IV, W.C., 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 200–209.
- Harbach, R.E., 2013. The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. In: Manguin, S. (Ed.), *Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors*. InTech, Rijeka, pp. 1–55.
- Heled, J., Drummond, A.J., 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Mol. Biol. Evol.* 27, 570–580.
- Higa, Y., Toma, T., Tsuda, Y., Miyagi, I., 2010. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago. *Japan. Jpn. J. Infect. Dis.* 63, 312–316.
- Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Setha, T., Min, S., Chang, M.S., Walton, C., 2009. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genet.* 10, 11.
- Huang, X., Madan, A., 1999. CAP 3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9, 868–877.
- Huelsensbeck, J.P., Bull, J.J., 1996. A Likelihood Ratio Test to Detect Conflicting Phylogenetic Signal. *Syst. Biol.* 45, 92–98.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Igea, J., Aymerich, P., Bannikova, A.A., Gosálbez, J., Castresana, J., 2015. Multilocus species trees and species delimitation in a temporal context: application to the water shrews of the genus *Neomys*. *BMC Evol. Biol.* 15 (209).
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649.
- Kendall, M.G., Smith, B.B., 1939. The Problem of m Rankings. *Ann. Math. Stat.* 10, 275–287.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- Knight, K.L., Stone, A., 1977. A Catalog of the Mosquitoes of the World. The Entomological Society of America, Maryland.
- Krzywinski, J., Wilkerson, R.C., Besansky, N.J., 2001. Evolution of mitochondrial and ribosomal gene sequences in Anophelinae (Diptera: Culicidae): implications for phylogeny reconstruction. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 479–487.
- Kubatko, L.S., Gibbs, H.L., Bloomquist, E.W., 2011. Inferring species-level phylogenies and taxonomic distinctiveness using multilocus data in *Sistrurus rattlesnakes*. *Syst. Biol.* 60, 393–409.
- Kumar, N.P., Rajavel, A.R., Natarajan, R., Jambulingam, P., 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 44, 1–7.
- Legendre, P., 2005. Species associations: the Kendall coefficient of concordance revisited. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 10, 226–245.
- Legendre, P., Lapointe, F.-J., 2004. Assessing Congruence among Distance Matrices: Single-Malt Scotch Whiskies Revisited. *Aust. N. Z. J. Stat* 46, 615–629.
- Leigh, J.W., Susko, E., Baumgartner, M., Roger, A.J., 2008. Testing congruence in phylogenomic analysis. *Syst. Biol.* 57, 104–115.
- Linton, Y.-M.M., 2009. Mosquito Barcoding Initiative. The First Barcode Release Paper WWW Document. In: Third Int. Barcode Life Conf., (accessed 9.11.15).
- Lopez, J.V., Yuhki, N., Masuda, R., Modi, W., O'Brien, S.J., 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J. Mol. Evol.* 39, 174–190.
- Montoya-Lerma, J., Murillo, C., Solarte, Y., 1987. Variación fenotípica de *Anopheles (K.) neivai* (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. *Colomb. Med.* 8, 25–27.
- Montoya-Lerma, J., Solarte, Y., Giraldo-Calderón, G.I., Quiñones, M.L., Ruiz-López, F., Wilkerson, R.C., González, R., 2011. Malaria vector species in Colombia - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 223–238.
- Moreno, M., Bickersmith, S., Harlow, W., Hildebrandt, J., McKeon, S.N., Silva-Do-Nascimento, T.F., Loaiza, J.R., Ruiz, F., Lourenço-De-Oliveira, R., Sallum, M.A.M., Bergo, E.S., Fritz, G.N., Wilkerson, R.C., Linton, Y.M., Juri, M.J.D., Rangel, Y., Póvoa, M.M., Gutiérrez-Builes, L. a, Correa, M.M., Conn, J.E., 2013. Phylogeography of the neotropical *Anopheles triannulatus* complex (Diptera: Culicidae) supports deep structure and complex patterns. *Parasit. Vectors* 6, 47.
- Müller, P., Pflüger, V., Wittwer, M., Ziegler, D., Chandre, F., Simard, F., Lengeler, C., 2013. Identification of cryptic *Anopheles* mosquito species by molecular protein profiling. *PLoS One* 8, e57486.
- Murillo, C., Astaiza, R., Fajardo, P., 1988. Biología de *Anopheles (Kerteszia) neivai* H. D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. III Medidas de luminosidad y el comportamiento de picadura. *Rev. Saude Publica* 22, 109–112.
- Olanov, V.A., Carrasquilla, G., Méndez, F., 1997. Transmisión de la malaria urbana en Buenaventura, Colombia: aspectos entomológicos. *Rev. Panam. Salud Pública* 1, 287–294.

- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290.
- Porter, C.H., Collins, F.H., 1996. Phylogeny of nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 6, 178–188.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16, 37–45.
- R Development Core Team, 2015. R: A Language and Environment for Statistical Computing [WWW Document]. R Found. Stat. Comput URL. <http://www.r-project.org>, Accessed date: 5 October 2015.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD: the Barcode of Life Data System. *Mol. Ecol. Notes* 7, 355–364.
- Ready, P.D., Day, J.C., Souza, de, Rangel, E.F., Davies, C.R., 1997. Mitochondrial DNA characterization of populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) incriminated in the peri-domestic and silvatic transmission of *Leishmania* species in Brazil. *Bull. Entomol. Res* 87, 187–195.
- Rona, L.D.P., Carvalho-Pinto, C.J. de, Peixoto, A., 2012. Speciation in Brazilian Atlantic Forest mosquitoes: A mini-review of the *Anopheles cruzii* species complex, in: Fusté, C. (Ed.), *Studies in Population Genetics*. INTECH Open Access Publisher, pp. 105–116.
- Rosa-Freitas, M.G., Lourenço-De-Oliveira, R., de Carvalho-Pinto, C.J., Flores-Mendoza, C., Silva-Do-Nascimento, T.F., 1998. Anopheline species complexes in Brazil. Current knowledge of those related to malaria transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93, 651–655.
- Sallum, M.A.M., Schultz, T.R., Foster, P.G., Aronstein, K., Wirtz, R.A., Wilkerson, R.C., 2002. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst. Entomol.* 27, 361–382.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R.H., 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 421–438.
- Schmidt, H. a, Strimmer, K., Vingron, M., von Haeseler, A., 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18, 502–504.
- Sinka, M.E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Van Boeckel, T., Kabaria, C.W., Harbach, R.E., Hay, S.I., 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit. Vectors* 3, 72.
- Stevenson, J.C., Norris, D.E., 2017. Implicating cryptic and novel anophelines as malaria vectors in Africa. *Insects* 8, 1–18.
- Suaza, J.D., Uribe, S.I., López, A., Porter, C., 2009. Estudio comparativo de *Anopheles neivai* Howard, Dyar & Knab (Diptera: Culicidae) de Guatemala y el pacífico colombiano a partir de secuencias de ADN mitocondrial, in: XXXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN. Sociedad Colombiana de Entomología, Medellín, pp. 149.
- Swofford, D., 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). (Version 4.).
- Uribe, S.I., Porter, C.H., Vélez, I.D., 1998. Amplificación y obtención de secuencias de rRNA mitocondrial en *Lutzomyia spp* (Diptera: Psychodidae) vectores de Leishmaniosis. *Rev. Colomb. Entomol.* 23, 177–185.
- Xia, X., 2017. DAMBE6: New tools for microbial genomics, phylogenetics, and molecular evolution. *J. Hered.* 108, 431–437.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L., Wang, Y., 2003. An index of substitution saturation and its application. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 1–7.
- Yeates, D.K., Seago, A., Leigh, N., Cameron, S.L., Joseph, L., Trueman, J.W.H., Nelson, L., Cameron, S.L., Joseph, L., Trueman, J.W.H., 2011. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Syst. Entomol.* 36, 209–217.
- Yoshida, R., Fukumizu, K., Vogiatzis, C., 2017. Multilocus phylogenetic analysis with gene tree clustering. *Ann. Oper. Res.* 1–21.
- Yule, G.U., 1925. A Mathematical Theory of Evolution based on the Conclusions of Dr. J.C. Willis, F.R.S. *J. R. Stat. Soc.* 88, 433–436.
- Zavortink, T.J., 1973. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* 9, 1–54.

Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated to guadua in municipalities of Anserma, Hispania and Jardín, Colombia

JOVANY BARAJAS G.¹, JUAN DAVID SUAZA V.², CAROLINA TORRES G.³, GUILLERMO LEÓN RÚA⁴, SANDRA URIBE-SOTO⁵ y CHARLES H. PORTER⁶

Resumen: El estudio de mosquitos de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) en Colombia, ha sido limitado a pesar de su importancia en salud pública. El presente estudio determinó las especies de esta subfamilia colectadas en *Guadua angustifolia* en ecosistemas de influencia cafetera. Se resaltan tres tipos de criaderos: tocón, entrecodo perforado y recipiente. Se registraron nueve especies de las cuales dos son nuevos registros para Colombia (*Orthopodomyia albicosta* y *Wyeomyia oblita*), cinco son nuevos registros para los departamentos visitados (*Culex secundus*, *Cx. antunesi*, *Limatus durhami*, *Trichoprosopon digitatum* y *Sabethes undosus*) y dos (*Trichoprosopon* sp. del complejo *Pallidiventer* y *Toxorhynchites* sp.) se encuentran en proceso de estudio. Se determinó que existe relación entre las especies encontradas y el volumen de agua contenida y la altura sobre el nivel del suelo medida en los criaderos. De las especies reportadas, *Tr. digitatum* y *Li. durhami* están registradas en la literatura como posibles vectores de arbovirus. *Toxorhynchites* se destaca por agrupar especies cuyas larvas son depredadoras. Los resultados realzan la importancia de la guadua como criadero de diferentes mosquitos, incluyendo algunas especies importantes en salud pública.

Palabras clave: Taxonomía. Culicidae. Hábitats larvales. Phytotelmata.

Abstract: The study of culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Colombia, has been limited even though this subfamily is important in public health. This study aimed to determine the species of Culicinae breeding in stands of *Guadua angustifolia* in areas with coffee plantations. Three breeding sites were distinguished: guadua stumps, perforated internodes and containers. Nine mosquito species were identified which two are new records for Colombia (*Orthopodomyia albicosta*, *Wyeomyia oblita*), five new records for the departments (*Culex secundus*, *Cx. antunesi*, *Limatus durhami*, *Trichoprosopon digitatum* and *Sabethes undosus*). Two others are under current study (*Trichoprosopon* sp. part of the *Pallidiventer* complex, and *Toxorhynchites* sp.). There was a relationship between the species found and the water volume and height above ground, measured for each of the breeding sites. Two of the species, *Tr. digitatum* and *Li. durhami*, are reported in literature as potential vectors of arboviral agents; *Toxorhynchites* is grouped with species whose larvae are predators. The results support an important role for guadua as breeding sites for various mosquitoes, including some species of public health importance.

Key words: Taxonomy. Culicidae. Larval habitats. Phytotelmata.

Introducción

En Colombia la investigación en taxonomía e identificación de mosquitos de la familia Culicidae (Insecta: Diptera) se ha realizado principalmente para los géneros *Anopheles* Meigen, 1818 y *Aedes* Meigen, 1818 y en particular en relación con las especies transmisoras de malaria y dengue (Suárez y Nelson 1981), respectivamente. Dichos estudios incluyen además de la identificación de especies, la distribución geográfica y otros aspectos relevantes para la implementación de actividades de control (Tinker y Olano 1993; Olano *et al.* 2001; Suarez 2001; Rodríguez y Hoz 2005). Estudios similares sobre otros géneros de Culicidae son escasos, lo cual probablemente se relaciona con su menor impacto en salud pública y el desconocimiento de la biología y taxonomía de sus especies (Barreto *et al.* 1996). No obstante, las grandes

modificaciones del paisaje y la expansión de la frontera agrícola en el país, así como los cambios relacionados con el clima, los cuales tienen gran incidencia en las dinámicas de las poblaciones de mosquitos y los agentes patógenos que transmiten, hacen necesario avanzar en el estudio y reconocimiento de estas otras especies. En particular esto es válido para las enfermedades conocidas como emergentes y reemergentes, muchas de las cuales se relacionan con arbovirus transmitidos por mosquitos (Gubler 2002).

En este contexto, cobra importancia el estudio de géneros de mosquitos como *Culex* Linnaeus, 1758, *Haemagogus* Williston, 1896, *Trichoprosopon* Theobald, 1901, *Wyeomyia* Theobald, 1901 y *Orthopodomyia* Theobald, 1904 en los cuales se incluyen especies transmisoras de arbovirus de la familia Bunyaviridae a animales y humanos, mosquitos que se han registrado en criaderos fitotelmata, unos de los cria-

¹ Biólogo-Estudiente de Maestría. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Sede de Investigación Universitaria SIU, Universidad de Antioquia. Carrera 53 No. 61-30, Torre 2, Laboratorio 632. j.barajas@pecet-colombia.org. Autor para correspondencia. ² Ingeniero agrónomo, MSc.-Estudiante de Doctorado convenio PECET-Grupo de Sistemática Molecular GSM (Universidad de Antioquia-Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín), Calle 59A No 63-20. Bloque 18-102 Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. jdsuaza@unal.edu.co. ³ Bióloga, M. Sc.-Estudiante de Doctorado, Profesora asociada a la Facultad de Medicina. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET, Sede de Investigación Universitaria SIU, Universidad de Antioquia. Carrera 53 No. 61-30, Torre 2, Laboratorio 632. carolina.torres@siu.udea.edu.co. ⁴ Biólogo, M. Sc., Ph. D. Profesor asociado a la Facultad de Medicina, Laboratorio de Hemoparasitosis y Entomología Médica. Universidad de Antioquia, Carrera 51d N° 62-29. Laboratorio 383. gl_rua@medicina.udea.edu.co. ⁵ Ingeniera agrónoma, M. Sc., Ph. D. Profesora asociada a la Facultad de Ciencias, Posgrado de Entomología Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Calle 59A No 63-20. Bloque 18-102 Medellín, Colombia. suribe@unal.edu.co. ⁶ Biólogo, M. Sc., Ph. D. Investigador. Centers for Disease Control and Prevention -CDC-, Atlanta, EE.UU. chp1@cdc.gov.

deros más antiguos de Culicidae (Forattini 1965a; Cyrino y Lopes 2001; Forattini 2002; Ferro *et al.* 2003) y que se exploraron en el presente estudio.

El término fitotelmata, como es definido por Fish (1983) y Greeney (2001), hace referencia a pequeños cuerpos de agua que se originan al interior o sobre diferentes estructuras de las plantas (axilas, brácteas, troncos, hojas, frutos, flores, etc.), en donde se desarrolla una o varias comunidades de organismos asociados, en los que se incluyen los mosquitos Culicidae. La abundancia de fitotelmata es reconocida en áreas silvestres, siendo la guadua muy abundante en los bosques andinos y zonas cafeteras, a pesar de esto, su papel como criadero de mosquitos ha sido pobremente explorado en Colombia.

La guadua, pertenece a la subfamilia Bambusoidea, es de gran presencia y abundancia en el trópico y posee características que la convierten en hábitat potencial para el desarrollo de los estados inmaduros de mosquitos (MacDonald y Traub 1960). Se ha postulado que el acceso al interior de los entrenudos de la planta es facilitado por aves e insectos del orden Orthoptera, lo que propicia la disponibilidad de espacios para la oviposición de hembras de mosquitos (Cyrino y Lopes 2001). Muchas de las especies de Culicidae previamente registradas en guadua son consideradas silvestres, pero su importancia aumenta cuando los parches de guadua se ubican en áreas periurbanas y urbanas (Cyrino y Lopes 2001; Forattini 2002).

Entre los trabajos más representativos sobre mosquitos criados en guadua se encuentran los realizados en guaduales naturales y otros utilizando trampas artificiales en Panamá (Galindo *et al.* 1951), Brasil (Silva *et al.* 2004), Venezuela (Machado-Allison *et al.* 1986; Lounibos *et al.* 1987, Navarro y Machado-Allison 1995; Navarro 1998) y Perú (Lounibos *et al.* 1987; Yanoviak *et al.* 2006; Navarro y Machado-Allison 1995; Yanoviak *et al.* 2006).

En Colombia, la mayoría de los trabajos son antiguos y discontinuos en el tiempo. Rozeboom y Komp (1930) registraron a *Cx. (Microculex) elongatus* Rozeboom-Komp, 1930 en entrenudos de guadua en el departamento del Meta. Después Roca-García (1944), Arnell (1973), Heinemann y Belkin (1978), Frank y Cutis (1981), Vélez *et al.* (1998) y Hastriter *et al.* (1998) registraron *Aedes albopictus* (Skuse, 1895), *Trichoprosopon digitatum* (Rondani, 1848), *Wyeomyia melanocephala* Dyar y Knab, 1906, *Haemagogus anastasionis* Dyar

1921, *Hg. janthinomys* Dyar 1921, *Hg. equinus* Theobald 1903, *Hg. celeste* Dyar y Nuñez Tovar, 1927, *Cx. (Carrollia) bihaicolus* Dyar y Nuñez Tovar, 1927 y *Toxorhynchites he-morrhoidalis* (Fabricius, 1787).

El presente estudio tuvo como objetivo determinar las especies de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) encontradas en guadua en algunos ecosistemas cafeteros de Colombia, explorando la relación posible entre dichos insectos y la planta.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en los municipios de Hispania y Jardín localizados en el suroeste de Antioquia y en el municipio de Anserma al oeste del departamento de Caldas (Tabla 1) (Fig. 1). En total se visitaron nueve sitios de colecta, con presencia de fragmentos de guadua dirigidos a la producción y conservación de esta planta, en áreas aledañas a zonas de actividades agrícolas, ganaderas y turísticas. La selección de los parches de guadua se realizó a partir de imágenes satelitales SPOT, mapas de cobertura vegetal e información extraída de los Planes de Ordenamiento Territorial de los municipios incluidos en el muestreo (Corantioquia 1999, 2002; Corcaldas 2000).

Para el muestreo se siguió la metodología de búsqueda y colecta propuesta por Belkin *et al.* (1969) y Louton *et al.* (1996). Los inmaduros se succionaron con una pipeta plástica y se registró el tipo de criadero, el volumen de agua (mL) y la altura sobre el suelo (cm), así como la temperatura y humedad relativa ambiental al momento de la colecta (Tabla 1) (Corantioquia 1999, 2002; Corcaldas 2000; IDEAM 2008). Las colectas se realizaron durante periodos de cuatro días en Hispania en noviembre de 2007 y en Jardín y Anserma en febrero y marzo de 2008. El esfuerzo de muestreo por sitio fue de 5 horas/hombre (2 personas por 4 días) haciendo un recorrido aleatorio en transectos de 200 m x 2 m. Como unidad de muestreo se utilizaron los criaderos positivos correspondientes a recipientes de guadua con presencia de inmaduros de Culicidae. Cada recipiente fue identificado con un código único con el fin de hacer un seguimiento de los mosquitos por criadero. La metodología basada en esfuerzo de muestreo entomológico (horas/hombre) ha sido implementada en diversos trabajos para caracterizar e inventariar insectos en

Tabla 1. Ubicación de las localidades visitadas para el muestreo de mosquitos de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) en tres municipios de Colombia.

Municipio	Sitio	Coordenadas geográficas		msnm	Zona de vida según Holdridge (1947)	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
		Norte	Occidente				
Hispania, Antioquia	1	05°45'16"	75°55'09"	1.045	Bh-T	24,3	57
	2	05°45'23"	75°54'56"	1.040		23,7	79
	3	05°35'34"	75°48'22"	1.840		17,5	83
Jardín, Antioquia	4	05°34'57"	75°47'13"	1.830	bh-PM	20,0	76
	5	05°34'55"	75°47'10"	1.840		20,0	76
	6	5°10'43"	75°40'42"	805		25,7	87
Anserma, Caldas	7	5°10'37"	75°40'39"	814	bmh-T	25,6	84
	8	5°10'13"	75°10'13"	875		25,1	83
	9	5°10'23"	75°40'07"	807		25,7	83

msnm: metros sobre el nivel del mar; Bh-T: bosque húmedo tropical; bh-PM: bosque húmedo premontano; bmh-T: bosque muy húmedo tropical.

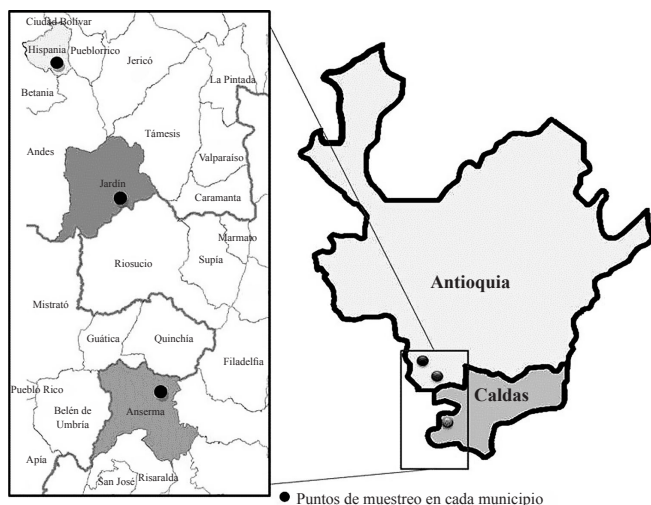


Figura 1. Localización geográfica de los puntos de muestreo para el estudio de mosquitos de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) en tres municipios de Colombia: Hispania, Jardín y Anserma.

diferentes tipos de hábitat (Arango *et al.* 2007; Rivera *et al.* 2008).

Las larvas colectadas se transportaron en bolsas plásticas Whirl-Pak hasta el insectario del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET- de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia (27 ± 2 °C; humedad relativa $80 \pm 10\%$; fotoperiodo: 12 horas luz), donde se individualizaron los estadios III y IV y se continuó su cría para la obtención de series entomológicas como colección de referencia.

Los protocolos de montaje de larvas, exuvias y adultos para la identificación de los mosquitos se realizaron de acuerdo a lo sugerido en el documento de la Walter Reed Biosystematics Unit, Division of Entomology, Walter Reed Army Institute of Research (WRBU) (Gaffigan y Pecor 1997). Los montajes se almacenaron en las colecciones entomológicas del PECET y el Museo Entomológico Francisco Luis Gallego (MEFLG) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín registradas ante el Instituto Alexander von Humboldt.

La identificación taxonómica se realizó mediante observación de caracteres morfológicos externos de larva, pupa y hembras adultas. La genitalia de machos adultos también fue considerada para la identificación de algunas especies. Se utilizaron claves y revisiones taxonómicas de diferentes autores: Berlin y Belkin (1980), Cova-García *et al.* (1966),

Tabla 2. Tipo y número de criaderos encontrados en *Guadua angustifolia* en cada municipio visitado para el muestreo de mosquitos de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) en tres municipios de Colombia.

Municipio	Tipo de criadero en <i>Guadua angustifolia</i>			Total
	Tocón	Entrenudo perforado	Recipiente	
Hispania	10	12	-	22
Jardín	11	-	-	11
Anserma	8	2	8	18
Total	29	14	8	51

Dyar (1982), Fernández *et al.* (2006), Forattini (1962; 1965; 2002), González y Carrejo (2007), González y Darsie (1996), Harbach (1994; 2007), Harbach y Kitching (1998), Judd (1996), Lane (1953; 1965), Lane y Cerqueira (1942), Valencia (1973), Zavortink (1968; 1981).

Para el análisis de correlación de las especies de mosquitos encontradas y las variables consideradas se utilizó el programa estadístico “R” (Hornik 2011). Se emplearon tablas de contingencia con la aplicación de la prueba estadística chi-cuadrado con nivel de significancia de 0,05 y el programa Statistical Package for the Social Sciences para Windows, versión 16 (2007) (SPSS Inc., Chicago, IL), con el que se realizó un análisis de correspondencia múltiple para establecer si existía independencia entre las especies y las características de los criaderos.

Resultados

En total se encontraron 51 criaderos en *Guadua angustifolia* (Tabla 2). Los criaderos correspondieron a tres tipos: (Tabla 2) (Fig. 2) (i) el tipo “tocón” cuyo contenedor se forma al realizar un corte transversal del culmo de la guadua permitiendo la acumulación de agua y materia orgánica en su interior; (ii) el tipo “entrenudo perforado” que se define como un entrenudo de guadua con una abertura lateral, que permite la entrada y almacenamiento de agua y (iii) el tipo “guadua caída”, que se refiere a la guadua sobre el suelo en posición horizontal con un corte longitudinal en el culmo que permite que en ciertos segmentos se acumule agua.

Se determinaron 518 especímenes obtenidos en los criaderos que correspondieron a *Culex* (*Carrollia*) *antunesi* Lane & Whitman, 1943, *Cx.* (*Carrollia*) *secundus* Bonne-Wepter, 1920 (Tribu Culicini); *Orthopodomyia albicosta* Lutz, 1905 (Tribu Orthopodomyiini); *Limatus durhami* Theobald, 1901, *Trichoprosopon* (*Trichoprosopon*) *digitatum*, *Sabethes* (*Sa-*



Figura 2. Criaderos encontrados en *G. angustifolia* durante el estudio de mosquitos de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) en tres municipios de Colombia. A. Tocón. B. Entrenudo perforado. C. Guadua caída.

Tabla 3. Tabla de contingencia y prueba chi-cuadrado para las especies de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae), según su procedencia geográfica y variables del criadero medidas (volumen de agua y altura sobre el suelo).

	Especie										Total	Valor P*
	<i>Culex (Carr) antunesi</i>	<i>Culex (Carr) secundus</i>	<i>Limatus durhami</i>	<i>Orthopodomyia albicosta</i>	<i>Sabethes undosus</i>	<i>Toxorhynchites sp.</i>	<i>Trichoprosopon digitatum</i>	<i>Trichoprosopon sp.</i>	<i>Wyeomyia obliterata</i>	+ Mat. no procesado		
Municipio												
Anserma	2	134	4	25	20	-	26	20	11	27	269	< 0,0001
Hispania	2	107	-	25	-	2	49	10	13	58	266	
Jardín	-	-	-	-	-	-	-	68	-	17	85	
Sin información	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Volumen (ml.)												
≤ 64	-	90	-	5	-	2	1	29	11	30	168	< 0,0001
65-114	1	27	-	9	2	-	41	38	-	23	141	
115-175	1	75	-	15	1	-	1	18	10	36	157	
≥ 176	2	49	4	21	17	-	32	13	3	13	154	
Sin información	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Altura (cm.)												
≤ 4	2	118	4	1	18	1	-	21	1	16	182	
5-15	-	36	-	2	2	1	20	40	-	27	128	
16-109	-	35	-	25	-	-	36	21	8	19	144	< 0,0001
≥ 110	2	52	-	22	-	-	19	16	15	40	166	
Sin información	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Total	4	241	4	50	20	2	75	98	24	102	620	

* Valores P de la prueba chi-cuadrado para *Cx. (Carr) secundus*, *O. albicosta*, *T. digitatum*, *Trichoprosopon sp.* y agrupación de las demás especies. +La columna de material no procesado, corresponde a especímenes muertos en estadios larvales I-III y en pupa. La sumatoria total vertical (número de individuos por especie) se hace para cada una de las variables.

bethinus) undosus Coquillett, 1906; *Wyeomyia (Wyeomyia) obliterata* Lutz, 1905 (Tribu Sabethini), *Trichoprosopon sp.* y *Toxorhynchites sp.* (Tribu Toxorhynchitini). Las especies presentes y su número según el tipo de criadero se muestran en la figura 3.

En la tabla de contingencia (Tabla 3), se relaciona la frecuencia de individuos de cada especie de mosquitos según la localidad y variables medidas para los criaderos. La prueba de chi-cuadrado evidencia la relación de las especies con cada una de las variables. En Anserma se colectó el mayor número de individuos (269), seguido por Hispania (266), mientras que en Jardín sólo se colectaron individuos de *Trichoprosopon sp.* (68) (Fig. 4A). En tocón se encontró la mayor cantidad de individuos de Culicidae (256). La especie con mayor número de especímenes fue *Culex secundus* (241) (Fig. 4B), colectada solamente en los municipios de Hispania y Anserma, en los tres tipos de criadero. Del género *Trichoprosopon* Theobald, 1901 se colectaron 98 individuos en los tres municipios, encontrados con mayor frecuencia en tocones. En Hispania y Anserma, *Tr. digitatum* (75) se colectó únicamente en tocones y entrenudos perforados (Fig. 4C) mientras que *Orthopodomyia albicosta* (50) estuvo en los tres tipos de criaderos (Fig. 4D). *Sabethes undosus* (20) sólo se registró en Anserma, siendo más frecuente en el criadero tipo guadua caída (Fig. 4E). *Wyeomyia obliterata* (Fig. 4F) (24) se colectó en Hispania y Anserma, mostrando mayor afinidad por los entrenudos perforados.

En la tabla 3 se destaca la frecuencia de *Cx. secundus* en criaderos con volúmenes de agua menores o iguales a 64 ml,

los individuos de *Trichoprosopon* en volúmenes entre 65-114 ml y *Or. albicosta* y *Sa. undosus* en criaderos con volúmenes mayores a o iguales a 176 ml. En los cuatro intervalos establecidos para la variable volumen, la frecuencia de especies fue similar.

Con respecto a la variable altura del criadero desde el suelo, es posible observar cierta selectividad de *Cx. secundus* y *Sa. undosus* en alturas menores o iguales a 4 cm, *Trichoprosopon sp.* entre 5-15 cm, *Or. albicosta* superiores a 16 cm, *Tr.*

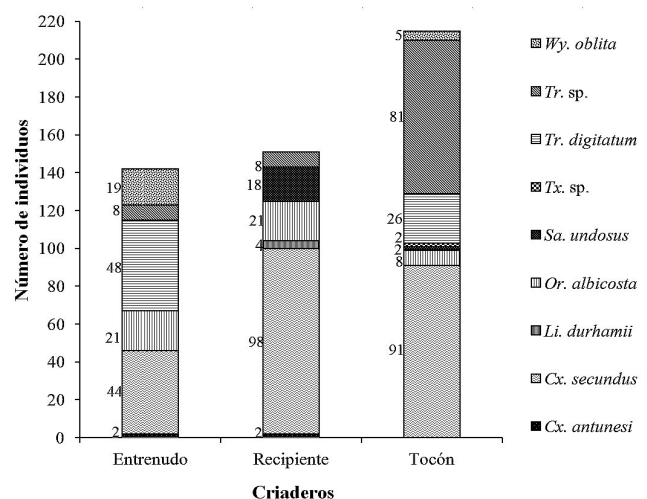
**Figura 3.** Frecuencia de individuos de cada especie de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) por tipo de criadero evaluado.

Tabla 4. Mosquitos de la subfamilia Culicinae incriminados como vectores potenciales de arbovirus, especies consideradas reservorio, distribución geográfica documentada, hábitat conocido y otros datos relacionados. Modificado de Hastriter *et al.* (1998).

Vector	Arbovirus	Reservorio de arbovirus	Distribución geográfica	Temporada de transmisión	Hábitat de inmaduros	Comportamiento de picadura
<i>Limatus durhami</i>	Caraparu Brasil Panamá	<i>Oryzomys capito</i> (Olfers, 1818) <i>Oryzomys laticeps</i> (Lund, 1840) <i>Proechimys guyanensis</i> (Saint-Hilaire, 1803) <i>Nectomys squamipes</i> (Brants, 1827) <i>Zygodontomys brevicauda</i> (Allen & Chapman, 1893) <i>Heteromys anomalus</i> (Thompson, 1815)	Centro y Sudamérica	Durante la temporada de lluvias (noviembre a marzo) en bosques tropicales	Hojas caídas y pequeños contenedores con abundante material vegetal en descomposición.	Pica a humanos en bosques intervenidos durante el día.
	Bussuquara (Panamá) SLE (Colombia, Ecuador) Wyeomyia (Colombia)	Bussuquara y Wyeomyia: "Mosquito". SLE: aves silvestres.	Centro y Sudamérica	Desconocido	Entrenudos de bambú, frutos caídos o cascara, hojas caídas contenedores artificiales, huecos en árboles, brácteas de flores de heliconias y axilas de hojas de bromelias.	Pica a humanos especialmente a nivel del suelo en bosques durante el día, siendo más abundante durante la noche.

digitatum entre 16 y 109 cm y *Wy. oblita* en alturas que sobrepasan los 110 cm. En cada uno de los cuatro intervalos de altura de los criaderos evaluados, la frecuencia de individuos fue similar.

Se encontró que todas las especies se relacionan estadísticamente con las variables localidad, tipo de criadero, altura sobre el suelo y volumen de agua *et al.* ($P < 0,0001$). Las especies *Cx. secundus*, *Tr. digitatum*, *Trichoprosopon* sp. y *Or. albicosta* se colectaron en todos los intervalos establecidos para las diferentes variables medidas en los criaderos. Las especies que se colectaron en menor número fueron *Cx. (Car.) antunesi* (4), *Li. durhami* (4) y *Toxorhynchites* sp. (2), provenientes de los parches de guadua localizados en Hispania y Anserma.

De las especies encontradas asociadas a *G. angustifolia*, *Tr. digitatum* y *Li. durhami* se señalan en la literatura como vectores de arbovirus (Hastriter *et al.* 1998; Natal 1998), la primera relacionada con la transmisión de los virus Bussuquara (Flaviviridae), Wyeomyia (Bunyaviridae), Pixuna (Togaviridae) y Encefalitis de San Luis (Flaviviridae), mientras que *Li. durhami* con los virus Caraparu (Bunyaviridae) y Wyeomyia (Tabla 4).

Discusión

De las especies encontradas asociadas a guadua se destacan como nuevos registros para Colombia *Or. albicosta* y *Wy. oblita* (Barreto-Reyes 1955; Barreto *et al.* 1996).

La literatura especializada para la subfamilia Culicinae es escasa para Colombia; los manuscritos que existen corresponden a estudios clásicos (Barreto-Reyes 1955; Lane 1965; Hieneman-Belkin 1978 y Valencia 1973), por lo que se recurrió a revisiones y claves taxonómicas elaboradas para especies de mosquitos de Venezuela, Brasil y Perú, que suponen una dificultad adicional, pues esta literatura es susceptible

de contener diferencias relevantes con las especies presentes en Colombia. Debido a esto, la identificación taxonómica se confirmó con especialistas de diferentes instituciones internacionales. Para el caso de las dos especies colectadas del género *Culex*, subgénero *Carrollia*, el estudio de los caracteres de larvas y genitalia masculina fueron determinantes para su separación ya que guardan gran similitud morfológica (Valencia 1973).

El poco número de inmaduros y un solo adulto de *Toxorhynchites* Theobald, 1901 supuso la mayor dificultad para su determinación. Las claves taxonómicas disponibles para su género cuentan con información limitada que impide la diferenciación de las especies. Lounibos y Campos (2002) lo señalaron como de difícil manejo taxonómico. *Toxorhynchites* está conformado por individuos no hematófagos y hembras autógenas, con larvas de hábito depredador que consumen inmaduros de otros mosquitos, por lo que este grupo representa gran interés en estudios de control biológico.

Para estudiar la fauna de culicidos asociada a guadua y, en general, a fitotelmatas es relevante considerar ciertas características ecológicas del hábitat, que indiquen criterios físicos que faciliten o restrinjan la distribución local de las especies. Estas características comprenden desde las zonas de vida hasta otras específicas de los microhábitat, como altura y volumen de agua (Louton *et al.* 1996; Zequi *et al.* 2005; Yanoviak *et al.* 2006). Según Yanoviak *et al.* (2006), *Li. durhami* y *Tr. digitatum* se han colectado en bosques húmedos tropicales de tierras bajas (Perú); de manera similar, existen registros para *Cx. secundus*, *Li. durhami* y *Tr. digitatum* en bosque lluvioso tropical y bosque húmedo tropical en diferentes departamentos de Colombia (Heinemann y Belkin 1978) y el trabajo de Machado-Allison *et al.* (1986) indica que *Sa. undosus*, *Tr. digitatum* y *Li. durhami* se colectaron en bosque lluvioso tropical (Venezuela). Las localidades muestreadas en este estudio corresponden a

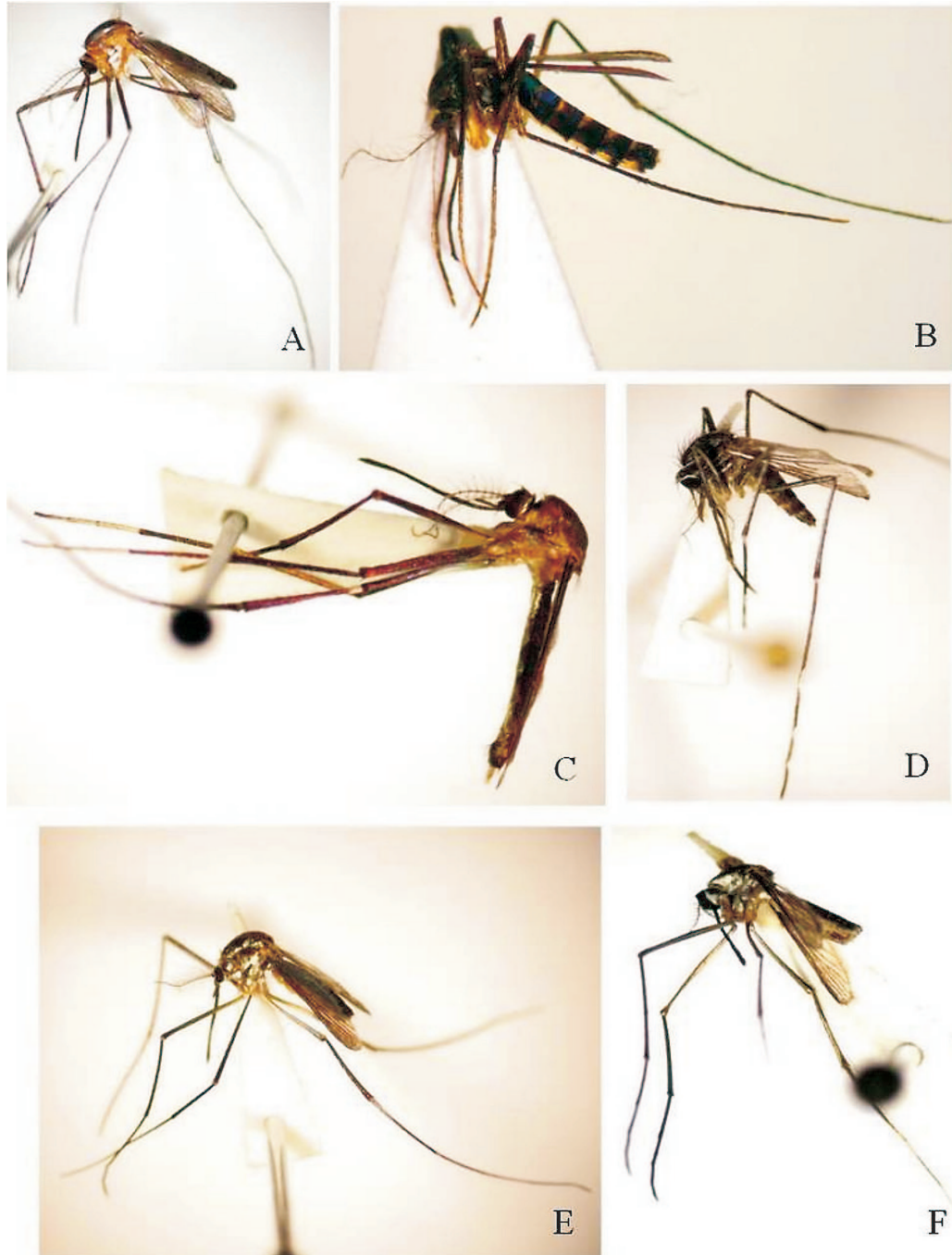


Figura 4. Ejemplares adultos de especies de la subfamilia Culicinae (Diptera: Culicidae) colectadas en *G. angustifolia* en tres municipios de Colombia. **4A.** *Trichoprosopon* sp. **4B.** *Cx. (Carrollia) secundus*. **4C.** *T. digitatum*. **4D.** *O. albicosta*. **4E.** *S. undosus*; **4F.** *W. oblita*.

guadales localizados en zonas de bosque húmedo premontano (Hispania y Jardín) y bosque húmedo tropical (Anserma), por lo que las características ambientales en las cuales ocurren las especies de Culicidae corresponden con regiones de altos niveles de humedad y temperatura.

La información disponible sobre intervalos altitudinales de distribución, que podrían explicar la ocurrencia de las especies asociadas a guadua, en diferentes zonas de vida, es limitada. La mayoría de estudios hacen énfasis en registrar especies, sin documentar debidamente los determinantes ecológicos de las mismas. En este estudio se realizaron co-

lectas en un intervalo entre 805 - 1845 m. Para *Cx. antunesi* Heinemann y Belkin (1978) indican que la especie tiene un intervalo de distribución hasta los 400 m (San Vicente de Chucurí-Santander), en tanto que Valencia (1973) registró colectas de la especie entre los 50 - 500m. El hallazgo de *C. antunesi* en este estudio fue entre 805 - 1040 m de altitud, por lo que por primera vez se documenta la presencia de esta especie en esta altitud. Para *Li. durhami*, *Cx. secundus*, *Tr. digitatum* y *Sa. undosus* los registros de distribución altitudinal coinciden con hallazgos previos citados por otros autores (Heinemann y Belkin 1978; Navarro y Machado-

Allison 1995; Navarro 1998; Yanoviak *et al.* 2006). El volumen de agua de los criaderos se consideró una variable determinante en la distribución de las especies, puesto que la disponibilidad de agua genera un microhábitat propicio para que los inmaduros de culicidos culminen su desarrollo. La permanencia de agua en estos criaderos influye sobre las especies, pues los ciclos de vida pueden variar entre diferentes grupos de Culicidae. Louton *et al.* (1996) mencionan que cuando la procedencia del agua es por efecto de la acción metabólica de la planta, como sucede con frecuencia en guadua, este volumen puede perdurar incluso en épocas de sequía, lo cual es muy favorable para la comunidad de invertebrados acuáticos que allí se desarrolla. Por otro lado, cuando el agua de los criaderos depende de la lluvia, pueden ocurrir grandes fluctuaciones afectando las comunidades de invertebrados que allí habitan (Murillo *et al.* 1988; Sunahara y Mogi 1997). Es de resaltar que aunque los volúmenes de agua medidos en los criaderos de guadua, en este estudio, no influyeron en la presencia de mosquitos Culicinae, la presencia permanente del líquido en los tres tipos de criaderos representan sitios de cría seguros para su desarrollo, incluso en periodos de sequía.

La altura a la cual se encuentra el criadero a lo largo del culmo de la guadua es otro factor que puede afectar la ocurrencia de diferentes especies de mosquitos. Cyrino y Lopes (2001) señalan que la mayor diversidad de especies se da en los primeros dos metros. Estos autores proponen también que las especies con comportamiento alimenticio similar se disponen en diferentes estratos altitudinales a lo largo de la guadua, de esta forma evitan competencia por alimento, e incluso por el mismo criadero, ya que este tipo de hábitat se considera altamente especializado. Los registros de altura de los criaderos muestreados en el presente estudio guardan relación con los datos de altura de criaderos en guadua encontrados en la literatura. En el caso de *Tr. digitatum*, *Sa. undosus* y *Toxorhynchites* sp. no hubo una agrupación detectable en los intervalos medidos (Tabla 3), mientras que los individuos de *Tr. digitatum* se registraron en criaderos por encima de 5 cm de altura, las otras dos especies son más frecuentes en criaderos por debajo de esta medida.

Algunas de las especies que son consideradas de amplia distribución por habitar diferentes tipos de criaderos, como *Tr. digitatum* y *Li. durhami* (Machado-Allison *et al.* 1986), muestran poca especificidad por las condiciones medidas en los sitios de cría encontrados en *G. angustifolia*. El caso contrario se observa en *Sa. undosus*, ya que sus individuos logran ovipositar en criaderos de bambú cuando poseen perforaciones muy pequeñas en sus entrenudos (Machado-Allison *et al.* 1986), lo que les facilita la colonización de criaderos de difícil acceso en guadua. Sin embargo, aun cuando la especie *Sa. undosus* fue encontrada en el presente estudio, el tipo de criadero en donde fue más frecuente corresponde con guadua caída, cuya abertura de acceso es considerablemente grande.

La prueba chi-cuadrado estableció la relevancia de las variables medidas en los criaderos (volumen de agua, altura y tipo del criadero) con la frecuencia de captura de las diferentes especies de Culicinae. Esta información facilita y direcciona futuros muestreos y estudios hacia grupos de mosquitos de interés.

El estudio taxonómico de mosquitos silvestres asociados a la guadua, planta cada vez más explotada en espacios agrícolas, domésticos y urbanos, permite identificar estos

escenarios como sitios de posible contacto entre el hombre y especies de mosquitos de importancia médica, por lo que la guadua debe ser considerada de interés epidemiológico.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la investigadora Libertad Ochoa (Universidad de Antioquia) y al estudiante Estiben Galeano (Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín), quienes apoyaron las actividades de campo y laboratorio del estudio. Al Dr. Iván Darío Vélez Bernal, director del PECET de la Universidad de Antioquia por su constante apoyo. A los especialistas internacionales Thomas Zavortink (Universidad de California - Davies - EE.UU.) y Monique Motta (Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz - Rio de Janeiro, Brasil) por la ayuda en la confirmación de las especies de Culicinae. La investigación se realizó con el apoyo financiero del CODI, Universidad de Antioquia (proyecto aprobado Código: EO1551) y Colciencias (proyecto aprobado No. 111545921858).

Literatura citada

- ARANGO, L.; MONTES, J. M.; LÓPEZ, D. A.; LÓPEZ, J. O. 2007. Mariposas (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea), escarabajos coprófagos (Coleoptera: Scarabaeidae) y hormigas (Hymenoptera: Formicidae) del ecoparque Alcázares – Arenillo (Manizales, Caldas – Colombia). Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural 11: 390-409.
- ARNELL, J. H. 1973. A revision of the genus *Haemagogus* (Mosquito Studies XXXII). Contributions of the American Entomological Institute 10 (2): 120-174.
- BARRETO, M.; BURBANO, M. E.; SUÁREZ, M.; BARRETO, P. 1996. *Psorophora ciliata* y otros mosquitos (Diptera: Culicidae) en Yolombó, Antioquia, Colombia. Colombia Médica 27 (2): 62-65.
- BARRETO-REYES, P. 1955. Lista de mosquitos de Colombia. Anales de la Sociedad de Biología 7 (2): 94.
- BELKIN, J. N.; SCHICK, R. X.; GALINDO, P.; AITKEN, T. H. G. 1969. Mosquito Studies (Diptera: Culicidae). I. A project for a systematic study of the mosquitoes of Middle America. Contribution of the American Entomological Institute 1 (2): 1-17.
- BERLIN, O. G. W.; BELKIN, J. N. 1980. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXVI. Subgenera *Aedinus*, *Tinolestes* and *Anoedioporpa* of *Culex*. Contribution of the American Entomological Institute 17 (2): 1-104.
- CORANTIOQUIA. 1999. Esquema de Ordenamiento Territorial (EOT), fase diagnóstico. Documento técnico. Municipio de Jardín. 1.
- CORANTIOQUIA. 2002. Plan básico de Ordenamiento Territorial (POT). Municipio de Hispania. 1.
- CORCALDAS. 2000. Plan básico de ordenamiento Territorial (POT). Municipio de Anserma. 1.
- COVA-GARCIA, P.; SUTIL, E.; RAUSSEO, J. A. 1966. Mosquitos de Venezuela, Tomo 1. Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social de Caracas, Venezuela. 1.
- CYRINO, J. A.; LOPES, J. 2001. Culicideofauna (Diptera) encontrada em entrenós de taquara de uma mata residual na área urbana de Londrina, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 18 (2): 429-438.
- DYAR, H. G. 1982. The Mosquitoes of the Americas. The Carnegie Institution of Washington. Publ. No. 387: 1-616.
- FERNÁNDEZ, L. D.; HERNÁNDEZ, C. A.; PÉREZ, R. Z.; QUIROGA, V. S. 2006. Contribución al estudio de la familia Culicidae de Guatemala: relación y distribución geográfica de las principales especies de la región norte. Revista Cubana de Medicina Tropical 58 (1): 30-35.

- FERRO, C.; BOSHELL, J.; MONCAYO, A. C.; GONZALEZ, M.; AHUMADA, M. L.; KANG, K.; WEAVER, S. C. 2003. Natural enzootic vectors of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in the Magdalena Valley, Colombia. *Emerging Infectious Diseases Journal* 9 (1): 49-54.
- FISH, D. 1983. Phytotelmata: Flora and fauna. pp. 1-27. In: Frank, J. H., Lounibos, L. P. (Eds.). *Phytotelmata: Terrestrial plants as hosts for aquatic insect communities*. Medford, New Jersey; Plexus, vii + 293 p.
- FORATTINI, O. P. 1962. *Entomologia medica. Parte geral, Diptera, Anophelini*. Vol I, 662 pp., illus. São Paulo.
- FORATTINI, O. P. 1965. *Entomologia Médica. Culicini: Culex, Aedes e Psorophora*. Vol. 2, 506 pp. Universidade de São Paulo, Brasil.
- FORATTINI, O. P. 1965. *Entomologia Médica. Culicini: Haemagogus, Mansonia, Culiseta, Sabethini, Toxorhynchitini*, arbovíroses, filaríose bancroftiana, genética. São Paulo: Editora da USP. v. 3, 415p.
- FORATTINI, O. P. 2002. *Culicidologia Médica*. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 666 p.
- FRANK, J. H.; CURTIS, G. 1981. On the bionomics of bromeliad-inhabiting mosquitoes. VI. A review of the bromeliad-inhabiting species. *Journal of the Florida Anti-Mosquito Association* 52: 4-23.
- GAFFIGAN, T.; PECOR, J. 1997. Collecting, rearing, mounting and shipping mosquitoes. Walter Reed Biosystematics Unit, Division of Entomology, Walter Reed Army Institute of Research.
- GALINDO, P.; CARPENTER, S. J.; TRAPIDO, H. 1951. Ecological observations on forest mosquitoes of an endemic yellow fever area in Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31 (1): 98-137.
- GONZÁLEZ, R.; CARREJO, N. S. 2007. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia, claves taxonómicas y notas de distribución. Santiago de Cali. 237 p.
- GONZÁLEZ, R.; DARSIE, R. F. 1996. Clave ilustrada para la determinación genérica de larvas de Culicidae de Colombia y el nuevo mundo. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle* 4 (1): 21-37.
- GREENEY, H. F. 2001. The insects of plant-held waters: a review and bibliography. *Journal of Tropical Ecology* 17 (1): 241-260.
- GUBLER, D. J. 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research* 33: 330-342.
- HARBACH, R. E. 1994. The subgenus *Sabethinus* of *Sabethes* (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology* 19 (1): 207-234.
- HARBACH, R. E.; KITCHING, I. J. 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology* 23: 327-370.
- HARBACH, R. E. 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668 (1): 591-538.
- HASTRITER, M. W.; LAWYER, P. G.; MAUER, D. J.; ROBBINS, R. G.; SCHULTZ, G. W.; STRICKMAN, D. A. 1998. Disease vector profile Colombia. Defense Pest Management Information Analysis Center. Washington, D.C., Armed Forces Pest Management Board. Disponible en: www.afpmb.org. [Fecha revisión: 25 mayo 2009].
- HEINEMANN, S. J.; BELKIN, J. N. 1978. Collection records of the project "Mosquitoes of Middle America". 12. Colombia (COA, COB, COL, COM). *Mosquito Systematics* 10 (4): 493-539.
- HORNİK, K. 2011. "The R FAQ". Disponible en: <http://cran.r-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>. [Fecha revisión: 3 julio 2009].
- IDEAM -Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. 2008. Meteorología y estudios ambientales. Mapas de precipitación mensual. En: <http://www.ideam.gov.co/sectores/agri/precipit/precipit.htm>. Colombia. [Fecha revisión: 31 marzo 2008].
- JUDD, D. 1996. Review of the systematics and phylogenetic relationships of the Sabethini (Diptera: Culicidae). *Systematic Entomology* 21 (1): 129-150.
- LANE, J. 1953. Neotropical Culicidae. Tribe Culicini, *Deinocerites, Uranotaenia, Mansonia, Orthopodomyia, Aedomyia, Aedes, Psorophora, Haemagogus*, Tribe Sabethini, *Trichoprosopon, Wyeomyia, Phoniomyia, Limatus, Sabethes*. University of São Paulo, Brazil.
- LANE, J. 1965. Neotropical Culicidae. Dixinae, Chaoborinae and Culicinae, tribes Anophelini, Toxorhynchitini and Culicini (Genus *Culex* only). University of São Paulo, Brazil.
- LANE, J.; CERQUEIRA, N. L. 1942. Os Sabetíneos da América (Diptera: Culicidae). *Arquivos de Zoologia de Sao Paulo* vol. III, art. IX, pp. [473]-849: ill.; 27 1/2 cm
- LOUNIBOS, L. P.; FRANK, J. H.; MACHADO-ALLISON, C. E.; OCANTO, P.; NAVARRO, J. C. 1987. Survival, development and predatory effects of mosquito larvae in Venezuelan phytotelmata. *Journal of Tropical Ecology* 3: 221-242.
- LOUNIBOS, L. P.; CAMPOS, R. E. 2002. Investigaciones recientes sobre *Toxorhynchites rutilus* (Diptera: Culicidae) con referencia al control biológico de mosquitos habitantes en recipientes. *Entomotropica*, antes *Boletín de Entomología Venezolana* 17 (2): 145-156.
- LOUTON, J.; GELHAUS, J.; BOUCHARD, R. 1996. The aquatic macrofauna of water-filled bamboo (Poaceae: Bambusoideae: Guadua) internodes in a Peruvian lowland tropical forest. *Biotropica* 28 (2): 228-242.
- MacDONALD, W. W.; TRAUB, R. 1960. Malaysian parasites XXXVII. An introduction to the ecology of the mosquitoes of the lowland dipterocarp forest of Selangor, Malaya. *Studies from the Institute of Medical Research, Malaya* 29: 79-110.
- MACHADO-ALLISON, C. E.; BARRERA, R.; DELGADO, L.; GÓMEZ-COVA, C.; NAVARRO, J. C. 1986. Mosquitos (Diptera: Culicidae) de los fitotelmata de panaquire, Venezuela. *Acta Biológica de Venezuela* 12 (2): 1-12.
- MURILLO, C.; ASTAIZA, R.; FAJARDO, P. 1988. Biología de *Anopheles (Kerteszia) neivai* H., D. & K., 1913 (Diptera: Culicidae) en la costa pacífica de Colombia. *Revista de Saúde Pública de São Paulo* 22 (2): 94-100.
- NATAL, D.; URBINATTI, P.; MARUCC, D. 1998. Arbovirus vector ecology in the Brazilian coastal range system. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, Av. Dr. Amaldo, 715, São Paulo, SP, Brasil. pp. 234-247. En: Travassos Da Rosa, A. P. A.; Vasconcelos, P. F.; Travassos da Rosa, J. F. An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries. Belém, Instituto Evandro Chaga.
- NAVARRO, J. C.; MACHADO-ALLISON, C. E. 1995. Aspectos Ecológicos de *Sabethes chloropterus* Humboldt (Diptera: Culicidae) en un bosque húmedo del Edo. Miranda Venezuela. *Boletín Entomológico de Venezuela* 10 (1): 91-104.
- NAVARRO, J. C. 1998. Fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae) del Parque Nacional Cerro El Copey y nuevos registros para La Isla de Margarita, Venezuela. *Boletín Entomológico de Venezuela* 13 (2): 187-194.
- OLANO, V. A.; BROCHERO, H. L.; SÁENZ, R.; QUIÑONES, M. L.; MOLINA, J. A. 2001. Mapas preliminares de la distribución de especies vectores de malaria en Colombia. *Biomédica* 21: 402-408.
- RIVERA-USME, J. J.; CAMACHO-PINZÓN, D. L.; BOTERO-BOTERO, A. 2008. Estructura numérica de la entomofauna acuática en 8 quebradas del departamento del Quindío-Colombia. *Acta Biológica Colombiana* 13 (2): 133-146.
- ROCA-GARCIA, M. 1944. Isolation of three neurotropic viruses from forest mosquitoes in eastern Colombia. *Journal of Infectious Diseases* 75: 160-169.
- RODRÍGUEZ, H.; DE LA HOZ, F. 2005. Dengue and dengue and vector behaviour in Cáqueza, Colombia, 2004. *Revista de Salud Pública* 7: 1-15.

- ROZEBOOM, L. E.; KOMP, W. H. W. 1930. A new *Microculex elongatus*, from Colombia, with notes on the subgenus. Proceedings of the Entomological Society of Washington 52.
- SILVA, A. M.; NUNES, V.; LOPES, J. 2004. Culicídeos associados a entrenós de bambu e bromélias, com ênfase em *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera, Culicidae) na Mata Atlântica, Paraná, Brasil. Iheringia, Série Zoológica 94 (1): 63-66.
- SUÁREZ, M. F.; NELSON, M. 1981. Registro altitudinal de *Aedes aegypti* en Colombia. Biomédica 1: 225.
- SUÁREZ, M. F. 2001. *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera, culicidae) en Buenaventura Colombia. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional 6: 222-223.
- SUNAHARA, T.; MOGI, M. 1997. Distributions of larval mosquitoes among bamboo-stump pools which vary in persistence and resource input. Researches on Population Ecology 39 (2): 173-179.
- TINKER, M. E.; OLANO, V. A. 1993. Ecología del *Aedes aegypti* en un pueblo de Colombia, Sur América. Biomédica 13: 5-14.
- VALENCIA, J. D. 1973. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXI. A revision of the subgenus *Carollia* of *Culex*. Contribution of the American Entomological Institute 9 (4): 1-134.
- VÉLEZ, I. D.; QUIÑONES, M. L.; SUÁREZ, M.; OLANO, V. A.; MURCIA, L. M.; CORREA, E.; ARÉVALO, C.; PÉREZ, L.; BROCHERO, H.; MORALES, A. 1998. Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. Biomédica 18 (3): 192-198.
- YANOVIK, S. P.; LOUNIBOS, L. P.; WEAVER, S. C. 2006. Land use affects macroinvertebrate community composition in phytotelmata in the Peruvian Amazon. Annals of the Entomological Society of America 99: 1172-1181.
- ZAVORTINK, T. J. 1968. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). VIII. A prodrome of the genus *Orthopodomyia*. Contributions of the American Entomological Institute 3 (2): 84-91.
- ZAVORTINK, T. J. 1981. Species complexes in the genus *Thichoproson*. Mosquito Systematics 13 (1): 82-85.
- ZEQUI, J. A. C.; LOPES, J.; MEDRI, I. M. 2005. Imaturos de Culicidae (Diptera) encontrados em recipientes instalados em mata residual no município de Londrina, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 22 (3): 656-661.

Recibido: 18-jul-2011 • Aceptado: 27-mar-2013



International Journal of Mosquito Research

ISSN: 2348-5906
CODEN: IJMRK2
IJMR 2017; 4(6): 10-24
© 2017 IJMR
Received: 03-09-2017
Accepted: 04-10-2017

Doris Rosero-García
Grupo de Investigación en
Sistemática Molecular, Facultad
de Ciencias, Universidad
Nacional de Colombia, Sede
Medellín, Calle 59A 63-20.
Bloque 16, Laboratorio 102.
Medellín, Colombia

Juan David Suaza-Vasco
Grupo de Investigación en
Sistemática Molecular, Facultad
de Ciencias, Universidad
Nacional de Colombia, Sede
Medellín, Calle 59A 63-20.
Bloque 16, Laboratorio 102.
Medellín, Colombia

Jovany Barajas-Galindo
Programa de Estudio y Control
de Enfermedades Tropicales-
PECET, Sede de Investigación
Universitaria SIU, Universidad
de Antioquia

Sandra Uribe-Soto
Grupo de Investigación en
Sistemática Molecular, Facultad
de Ciencias, Universidad
Nacional de Colombia, Sede
Medellín, Calle 59A 63-20.
Bloque 16, Laboratorio 102.
Medellín, Colombia

Correspondence

Doris Rosero-García
Grupo de Investigación en
Sistemática Molecular, Facultad
de Ciencias, Universidad
Nacional de Colombia, Sede
Medellín, Calle 59A 63-20.
Bloque 16, Laboratorio 102.
Medellín, Colombia

Mosquito fauna (Diptera: Culicidae) of high Andean mountain ecosystems in Colombia

Doris Rosero-García, Juan David Suaza-Vasco, Jovany Barajas-Galindo and Sandra Uribe-Soto

Abstract

An annotated list of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) known to occur in Colombia above 2,000 m is analyzed in present study. To study the mosquito fauna present in high Andean mountain ecosystems in the Departments of Antioquia and Quindío, sampling was carried out by rapid biodiversity assessment during May 2008 and September 2016. In addition, all records of Culicidae obtained from the scientific literature were included in the data analysis. As a pioneering work, this checklist updates the mosquito fauna above 2,000 m to a total of 35 species representing 11 genera and 15 subgenera. This list adds valuable information to the knowledge of biodiversity in Colombia and contributes to the establishment of a baseline for future research.

Keywords: Biodiversity, mosquitoes, mosquito fauna, highland, Colombia

Introduction

Colombia is known globally for its mega diversity, including mosquito fauna, with an estimation of 353 species [1]. High altitude sites are a specific category of ecosystem with a diversity of habitats such as lakes, ponds, rivers, water-containing plants [2]. In general, in Colombia, there is little information for this insect group over 2,000 m although there are some records of Diptera in three different ecological sites in the Parque Nacional Natural Chingaza at 3,200 m [3, 4], the Usme locality in Bogotá, between 3,080-3,315 m [5], and the Páramo Andino of Monserrate at 3,230 m [6], all sites in the Department of Cundinamarca. In the Parque Nacional los Nevados of the Caldas Department, some dipterans have been studied that occur at 4,000-4,400 m, the highest altitude recorded in Colombia [7]. However, the four records mentioned above do not include any specimens from the family Culicidae. Recently, one culicid morphospecies was collected in the municipality of Tenjo, Cundinamarca Department at 2,714- 2,765 m [8].

Specifically, for mosquitoes, in three localities of the Cundinamarca Department; Mosquera (2,516 m), Fusagasugá (1,728 m), and Girardot (269 m), specimens of *Culex* (*Culex*) *quinquefasciatus* Say, 1823 were collected for studies of development time, survival, mortality and life expectancy under laboratory conditions similar to their place of origin. Significant differences were found only in development time between Mosquera (15.05 days) and Girardot (7.72 days). Garcia *et al.* 2010 suggested that differences in life expectancy for a recently oviposited egg in Girardot (26.06 days), Fusagasugá (24.12 days) and Mosquera (40.77 days) demonstrate adaptation to lower temperatures at higher elevations [9]. Recently, *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) was reported in the Bello municipality in the Antioquia Department, within a range in altitude from 1,882-2,659 m. Also, dengue virus was detected in *Ae. aegypti* collected in the same municipality at 1,984 m [10]. In another study, species of the tribe Sabethini were reported above 2,000 m in the northern Andean coffee-growing regions of Colombia [11]. Considering the new distribution records for mosquitoes and their importance, the objective of the present study was to compile a list of Culicidae in high altitude zones of the country to establish a baseline for future research with these insects. This paper presents the results of recent surveys of mosquitoes above 2,000 m in two Departments of Colombia, Antioquia and Quindío with a review of past records from publications and reports in the country.

Materials and methods

Study site and data collection: From May 2008 to September 2016 mosquito collections were made in six representative municipalities of Antioquia Department and one locality of Quindío Department. Elevation of the sampling sites ranged from 2,000-2,802 m. Mosquito sampling was based on the methodology proposed for rapid biodiversity assessment [12–14]. Mosquito larvae were found in several distinct microhabitats, such as phytotelmata, as well as other natural and artificial aquatic habitats. Adult mosquitoes were captured using Shannon traps, oral aspirators and insect nets. All collection sites in the field were geo-referenced. All field collections were transported to laboratories of the Programa de Estudio y Control de Enfermedades (PECET) at the Universidad de Antioquia and Insectary of Grupo de Investigación en Sistemática Molecular (GSMUN) at the Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Larval and pupal exuviae were obtained under laboratory conditions, following a standard protocol [15].

Data analysis: Specimens were identified using morphological keys and reviews available for Neotropical Culicidae [16–19]. For each genus and subgenus, we used keys as follows: *Aedes (Howardina)* [20]; *Aedes (Ochlerotatus)* [21]; *Anopheles (Kerteszia)* [22–24]; *Culex* [25–27]; *Johnbelkinia* [28]; *Trichoprosopon* [28,29]; and *Wyeomyia (Nunezia)* [30,31]. Generic and subgeneric names of aedine mosquitoes follow the most recent classification proposed by Wilkerson *et al.* 2015 [32].

Identified specimens were deposited in the Entomological Museum Francisco Luis Gallego-MEFLG at the Universidad Nacional de Colombia, Medellín campus, collection codes NC36977-NC38176. In addition, mosquito records were obtained from publications and reports located *via* a review of relevant literature. This literature survey was completed in July 2017.

Results

A total of 1,200 specimens were collected, representing eight genera and 10 subgenera. The most diverse tribe was Culicini (493 specimens) followed by Aedini (479 specimens). This study in addition to literature records is the first checklist of mosquitoes above 2,000 m in Colombia with at least 35 species belonging to 11 genera and 15 subgenera. Previously, based only on published records, 11 genera, 11 subgenera and 30 species had been recorded. The mosquito list from high Andean mountain ecosystems in Colombia provided below is based on records from 60 collection sites in seven Departments between 2,000-3,250 m: Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Huila, Nariño, Quindío and Santander (Figure 1). The lowest altitude was for *Aedes (Ochlerotatus) euiris* (Dyar, 1922), *Aedes* sp. and *Culex* Subgenus *Culex* in Chipaque at 2,000 m and the highest for *Ae. (Och.) euiris* in Choachí at 3,250 m, both municipalities in the Cundinamarca Department [33]. Species from the tribes Sabethini and Uranotaeniini have been collected only as high as 2,977 m and 2,700 m respectively (Table 1).

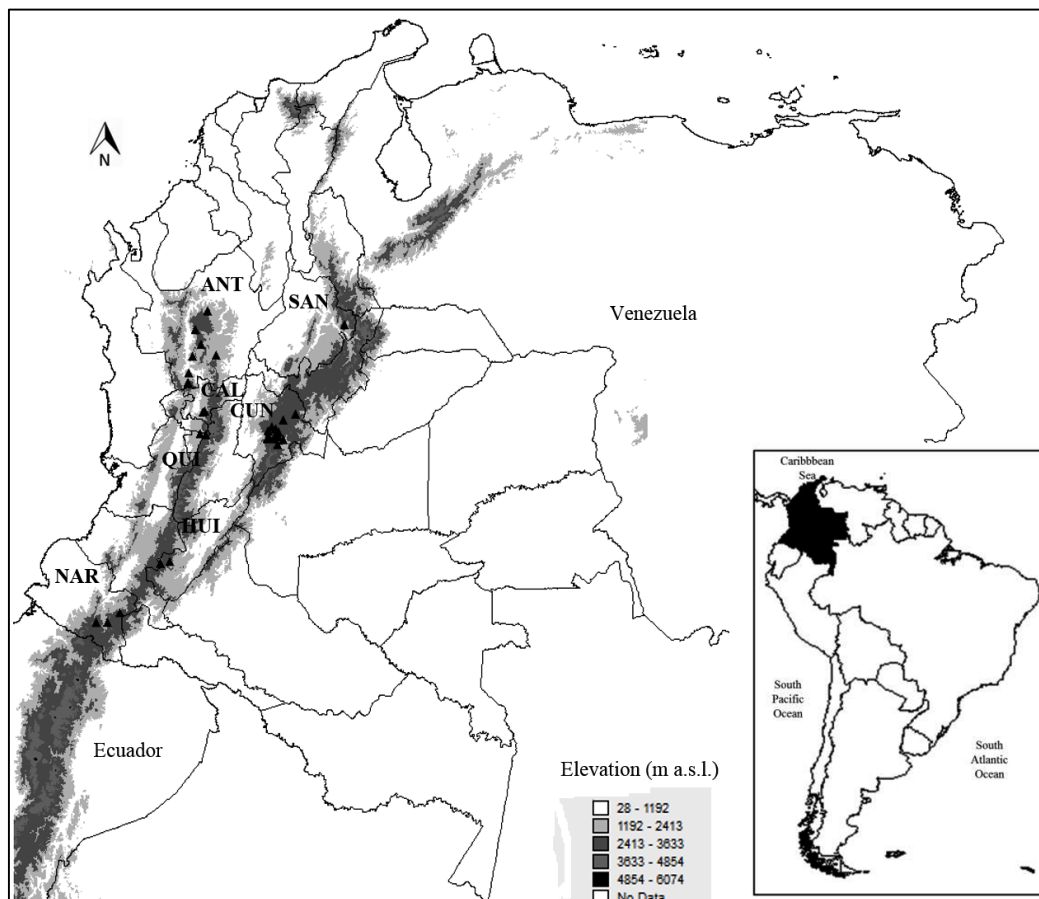


Fig 1: Map of sites for mosquito records above 2,000 m in Colombia. ANT: Antioquia, CAL: Caldas, CUN: Cundinamarca, HUI: Huila, NAR: Nariño, QUI: Quindío, SAN: Santander.

Some immature specimens collected in rock holes in Bogotá at 2,650 m, and adult females biting humans in partial forest in Chipaque at 2,000 m, included in the present list, were not available for the Project “Mosquitoes of Middle America” [33]. Records with changes in nomenclature are depicted by*.

Subfamily Anophelinae

1. *Anopheles (Anopheles) pseudopunctipennis* Theobald, 1901
2. *Anopheles (Kerteszia) Boliviensis* Group (Navarro *et al.* 2010)
3. *Anopheles (Lophopodomyia) oiketorakras* Osorno-Mesa, 1947*
4. *Anopheles (Nyssorhynchus) argyritarsis* Robineau-Desvoidy, 1827

Subfamily Culicinae

Tribe Aedini

5. *Haemagogus* sp.
6. *Aedes (Howardina)* sp.
7. *Aedes (Howardina)* sp. Eleanorae Group (Berlin, 1969)
8. *Aedes (Howardina) eleanorae* (Berlin, 1969)
9. *Aedes (Howardina) leei* (Berlin, 1969)
10. *Aedes (Howardina) marinkellei* (Berlin, 1969)
11. *Aedes (Howardina) marinkellei/ osornoi* hybrid (Berlin, 1969)
12. *Aedes (Howardina) osornoi* (Berlin, 1969)
13. *Aedes (Howardina) quadrivittatus* (Coquillett, 1902)*
14. *Aedes (Ochlerotatus)* sp.
15. *Aedes (Ochlerotatus) bogotanus* (Arnell, 1976)*
16. *Aedes (Ochlerotatus) deficiens* (Arnell, 1976)*
17. *Aedes (Ochlerotatus) euiris* (Dyar, 1922)*
18. *Aedes (Ochlerotatus) milleri* (Dyar, 1922)*
19. *Aedes* sp.
20. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762)

Tribe Culicini

21. *Culex* sp.
22. *Culex (Anoedioparpa) conservator* Dyar & Knab, 1906
23. *Culex* subgenus *Carrollia*
24. *Culex (Carrollia) bihaicola* Dyar & Nuñez Tovar, 1928*
25. *Culex (Carrollia) secundus* Bonne-Wepster & Bonne, 1920
26. *Culex* subgenus *Culex*
27. *Culex (Culex) acharistus* Root, 1927
28. *Culex (Culex) coronator* Dyar & Knab 1906
29. *Culex (Culex) chitae* Duret, 1967
30. *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823
31. *Culex* Subgenus *Microculex*
32. *Culex (Microculex) aureus* Lane & Whitman, 1951
33. *Culex (Microculex) imitator* Theobald, 1903
34. *Culex* Subgenus *Neoculex*

Tribe Orthopodomyiini

35. *Orthopodomyia* sp.

Tribe Sabethini

36. *Johnbelkinia* sp.
37. *Sabethes* sp.
38. *Sabethes* Subgenus *Sabethoides*
39. *Shannoniana fluviatilis* (Theobald, 1903)
40. *Trichoprosopon* sp.

41. *Trichoprosopon evansae* Antunes, 1942
42. *Trichoprosopon pallidiventer* (Lutz, 1905) s.l.
43. *Trichoprosopon* sp. A (Suaza-Vasco *et al.* 2015)
44. *Trichoprosopon* sp. B (Suaza-Vasco *et al.* 2015)
45. *Wyeomyia* sp.
46. *Wyeomyia* aff. *phroso* Howard, Dyar & Knab 1915
47. *Wyeomyia* Subgenus *Nunezia*
48. *Wyeomyia (Nunezia)* sp. A (Suaza-Vasco *et al.* 2015)
49. *Wyeomyia (Nunezia)* sp. B (Suaza-Vasco *et al.* 2015)

Tribe Uranotaeniini

50. *Uranotaenia* Subgenus *Uranotaenia*
51. *Uranotaenia riverai* Duret, 1970

Some relevant aspects of general distribution, main characters used in the morphological identification, altitude records and ecological or health importance of these species are described below and summarized in Table 1. For remarks on the identification of mosquitoes reported in the literature, we recommend checking the original paper in which the species were reported.

1. *Anopheles pseudopunctipennis*: This species is recognized as a complex of at least three species, and it is an important vector of malarial plasmodia in the foothills and mountainous regions of the Andean countries of South America [34–36]. In Bolivia, for example, this species has always been found in exposed, clear, slow-moving water, almost always associated with filamentous algae. Above 1,000 m *An. pseudopunctipennis* is the only species considered to be a vector of malarial parasites in Bolivia and is a priority in control efforts [37]. In Colombia, is a secondary vector of *Plasmodium* spp. [38, 39] and has been reported above 2,000 m in the Department of Caldas [40].

2. *Anopheles (Kerteszia) sp.*: The specimen reported here appears to be a species of the Boliviensis Group, which includes *Anopheles boliviensis* (Theobald, 1905), *Anopheles gonzalezrinconesi* (Cova García, Pulido F. & Escalante de Ugueto, 1977) and *Anopheles rollai* (Cova García, Pulido F. & Escalante de Ugueto, 1977). These species have been reported in sympatry in high altitude areas associated with forest bromeliads at 2,232 m in the Parque Nacional Dinira in Venezuela [41–43]. Currently, the three species cannot be separated using morphological characters [23]; moreover, the adult male and immature stages of *An. boliviensis* are unknown and the adult male of *An. rollai* has not been completely studied [23, 24, 44]. Studies of this group in Colombia are uncommon, old and questionable, with some records of *An. boliviensis* in the Departments of Meta, Huila, Tolima, Cundinamarca, Caldas and Chocó [22]. *Anopheles boliviensis* is the only species recorded in Colombia and it is considered to be a seasonal vector [38, 39, 45]. This species was detected infected with Anopheles A and Anopheles B viruses in Horizonte, Villavicencio of the Meta Department [46] and carrying the eggs of *Dermatobia hominis* (Linnaeus, 1781), a large fly that is important in public health [47]. Recently, in the Antioquia Department third- and fourth-instar larvae of Boliviensis Group were collected in forest bromeliads at 2,600 m in the Reserva forestal El Romeral, Angelópolis [48]. Additionally, adult females were collected by Shannon trap in Jardín at 2,400 m [49] and entomological nets in Páramo de

Santa Inés, Belmira at 2,977 m^[50], both municipalities in the Antioquia Department. In the present study, six larvae were collected in bromeliads at 2,521 m; nine females were collected by Shannon trap at 2,403 m and 15 females by oral aspirator at 2,100 m in Jardín. In addition, one larva was collected in a bromeliad at 2,755 m in Yarumal in the Antioquia Department. The characters for identification of these specimens were spots on the palpi, legs and wings, as well the general coloration of the adult females, abdominal terga II-VII with numerous dark decumbent scales and sterna with few white scales^[23, 24].

3. *Anopheles oiketorakras*: Type-loc: Bogotá, Cundinamarca, Colombia (USNM-United States National Museum, now National Museum of Natural History; Smithsonian Institution; Washington, DC). This species, known only from Colombia, was described from larvae collected in la hoya hidrográfica del río San Francisco, a mountainous region at east of Bogotá between 2,700-2,840 m^[51]. The habitats for immature stages are shaded stream pools rich in organic matter^[51]. The other record of this species is from Túquerres at 3,104 m in the Nariño Department^[22]. Recently, two females were collected in the Páramo de Santa Inés, Belmira employing a CDC trap at 2,862 m^[50].

4. *Anopheles argyritarsis*: In Bolivia, this species shares the same geographical distribution as *An. pseudopunctipennis* above 1,000 m^[37]. Although the exact role of this species in the transmission of *Plasmodium* parasites is unclear^[52], some publications reported that it may contribute as a vector when present at high densities^[53]. In the Nariño Department, this species was collected in a pond along a road in Funes at 1,720 m, and the highest record is at 2,800 m in the Laguna de la Cocha, Pasto^[33]. Other records for this species above 2,000 m are described in table 1 and correspond to the Departments of Antioquia and Caldas^[40].

5. *Haemagogus* sp.: Some species of this genus are vectors of the sylvan cycle of yellow fever virus^[54-56]. Of the eight species recorded from Colombia, six are lowland species and two could be highland species^[54, 57-59]. *Haemagogus (Haemagogus) andinus* Osorno-Mesa, 1944 and *Haemagogus (Haemagogus) equinus* Theobald, 1903 are known to occur at 1,746 m in a coffee plantation near Fusagasugá, in the Cundinamarca Department^[54]. Recently, species of *Haemagogus* were collected from bromeliads in two localities in the Cundinamarca Department above 3,000 m^[60, 61].

6. *Aedes (Howardina) sp.*: A total of 35 species of this subgenus were recognized: five species in one group in the Fulvithorax Section; 11 species in five groups in the Walkeri Section; and 19 species in six groups in the Sexlineatus Section, which is primarily associated with the mountain regions of Central America and western South America^[20]. Little information is available on the medical importance of species of *Ae. (Howardina)*, and more investigations should be conducted to understand the actual role of these species as vectors^[20]. In a recent study, in the Antioquia Department, 83 specimens were collected in the Páramo de Santa Inés, Belmira between 2,734-3,098 m using different collecting methods and 33 females were identified as *Ae. (How.) aff. brevis/spinosus*^[50]. In addition, a total of 230 specimens were

identified as *Ae. (Howardina) sp.* and were collected from bromeliads: three larvae, 10 females and 10 males between 2,704-2,802 m in the Reserva Ecológica Cuchilla Alto El Romeral, Angelópolis and 23 larvae, 48 females and six males between 2,092-2,521 m in Jardín. Also, adult females were collected using different methods: entomological nets at 2,253 m (10 females), oral aspirator at 2,100 m (three females) and Shannon trap between 2,251-2,403 m (108 females) in Jardín. Only one larva was collected from a bromeliad at 2,173 m in Támesis. Lastly, seven specimens were collected from bromeliads (five larvae, two males) at 2,755 m in Yarumal and two females were collected by oral aspirator at 2,100 m in Jardín that were identified as belonging to the Fulvithorax Section. In the adults, the most important taxonomic characters pertain to the ornamentation of the mesonotum, which usually consists of lines of pale scales superimposed on a background of dark scales. The fourth-instar larvae show many taxonomic characters at the section and group levels that are usually concordant with those of adult ornamentation, and many reliable specific differences^[20].

7. *Aedes (Howardina) Eleanorae Group*: This group includes species that are difficult to identify based on morphological characters: *Ae. (How.) marinkellei* is morphologically similar to *Ae. (How.) osornoi* and *Ae. (How.) leei*. Although Berlin (1969) mentions the possibility of a natural hybrid between these two species have not been collected together in the same bromeliad^[20]. Other species of this group include *Ae. (How.) eleanorae*, *Ae. (How.) ecuadoriensis* and *Ae. (How.) brevivittatus*. Recently, 30 specimens were identified as Eleanorae Group that were collected at 2,734-3,098 m using different collecting methods in Páramo Santa Inés, Belmira, in the Antioquia Department^[50]. In addition, 18 females morphologically identified as members of this group were collected as follows: one specimen from a bromeliad at 2,802 m in the Reserva Ecológica Cuchilla Alto El Romeral, Angelópolis and other specimens by oral aspirator at 2,100 in Jardín. The main morphological characters in adults are based on usually creamy to golden lines of scales on the mesonotum, except in *Ae. (How.) ecuadoriensis* in which inner dorsocentral and lateral marginal lines are white. In larvae, seta 15-C is usually single or double, moderate in length, reaching the level of the middle of the dorsomentum^[20].

8. *Aedes (Howardina) eleanorae*: Type-loc: Buriticá, Antioquia, Colombia (USNM). This species, known only from Colombia, is found in epiphytic bromeliads at elevations around 1,524 m. At present it is known from Buriticá in the northern part of the Cordillera Occidental, Buena Vista in the upper part of the Orinoco basin on the eastern slope of the Cordillera Oriental^[20] and adult females collected in Páramo de Santa Inés, Belmira between 2,734-2,862 m^[50].

9. *Aedes (Howardina) leei*: Type-loc: Puracé, Huila, Colombia (USNM). The larvae and adults of this species are known from bromeliads and human landing collections, respectively, from the type locality at 2,926-3,100 m^[20, 33]. Another definite record is a single adult female from Zongo near La Paz, Bolivia and probably this species will eventually be found in areas between Ecuador and Perú^[20].

10. *Aedes (Howardina) marinkellei*: Type-loc: Suba, Bogotá, Cundinamarca, Colombia (USNM). This species is known to occur only in Colombia. Immature stages have been found in bromeliads at elevations between 2,580-2,650 m^[20, 33]. Adult females of this species are apparently at least occasionally attracted to humans^[20].

11. *Aedes (Howardina) marinkellei/osornoi* hybrid: A single reared adult female of *Ae. (How.) marinkellei* collected in the Cundinamarca Department at 2,650 m^[20, 33]. This species exhibits features of *Ae. (How.) osornoi* in adult ornamentation and in the immature stages, suggesting hybridization between the species. Although found in the same general locality, *Ae. (How.) osornoi* and *Ae. (How.) marinkellei* have not been collected together in the same bromeliad axils^[20].

12. *Aedes (Howardina) osornoi*: Type-loc: Chorro de Padilla, Rio San Francisco, Bogotá, Cundinamarca, Colombia (USNM). The known larval habitats of this species are epiphytic bromeliads above 2,650 m^[20, 33]. Remarkably, three females and one male identified as *Ae. (How.) aff. osornoi* and two larvae as *Ae. (How.) osornoi* were collected in the Páramo de Santa Inés, Belmira between 2,734-3,098 m^[50]. In addition, 13 females were collected by oral aspirator at 2,100 m in Jardín and were identified as *Ae. (How.) aff. osornoi*. In general, the morphological characters were compatible with *Ae. (How.) osornoi*, but all mesonotal golden lines were thicker than in *Ae. (How.) osornoi* and *Ae. (How.) eleanorae*.

13. *Aedes (Howardina) quadrivittatus*: Apparently, the larval habitats of this species are exclusively epiphytic bromeliads above 1,219 m^[20]. Adult females of this species are attracted to humans. An unidentified arbovirus was isolated from specimens collected in Panamá^[62]. Specimens of this species were collected above 2,700 m in Bogotá^[51].

14. *Aedes (Ochlerotatus) sp.*: Co-evolutionary relationships have been suggested between some species of the *Ochlerotatus* and Orthobunyavirus in North America^[63]. *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848) is a potential vector of microfilariae and arboviruses in the southeastern region of Brazil^[64]. However, in a recent study it was not possible to find a statistically significant effect of the Orthobunyavirus-*Ochlerotatus* pairings on experimental eVT rates^[65]. Recently, one female was collected at 2,862 m by oral aspirator in the Páramo de Santa Inés, Belmira^[50]. In the present study, a total of 152 specimens of *Aedes (Ochlerotatus)* species were collected by oral aspirator (one female) and in a single rock pool at 2,100 m in Jardín. In addition, seven larvae were collected in an artificial container at 2,799 m in Yarumal. Adult females of *Ae. (Ochlerotatus)* were recognized from specimens of other subgenera of *Aedes* by the basal bands on the abdomen and the color pattern formed by scales covering the mesonotum. Other characters for both sexes were the narrow decumbent head scales in a rather broad median patch and the erect scales usually numerous and extending onto the disc of the vertex. For larvae, the most important characters were the complete saddle and a ventral brush with seven to nine pairs of setae; siphon usually over twice as long as its breadth at the base^[17, 66]. In most cases, *Aedes* mosquitoes share a combination of morphological features and are best separated at the species level^[67].

15. *Aedes (Ochlerotatus) bogotanus*: Type-loc: Ogamora, Soacha, Cundinamarca, Colombia (USNM) at 2,400 m. This species is known only from the vicinity of Bogotá in Soacha at 2,400 m and in Usaquen at 2,640 m^[21, 33]. Larvae were collected in a small ground pool in a garden with abundant vegetation and a volcanic rock hole in a pasture, with temporary water and without vegetation^[21, 33].

16. *Aedes (Ochlerotatus) deficiens*: Type-loc: Suba, Cundinamarca, Colombia (USNM). This species is only known to occur in Colombia. It has been collected only at 2,580 m^[21, 33].

17. *Aedes (Ochlerotatus) euiris*: Type-loc: Bogotá, Cundinamarca, Colombia (USNM). In Venezuela, this species was collected as an adult in Páramo Batallón and La Negra at 3,133 m^[41, 68, 69]. In Colombia, two females collected in Bogotá between 2,700-2,840 m in a Magoon trap^[51] and one female collected in Belmira at 3,200 m in a CDC light trap^[70] were originally identified as *Ae. (Och.) euiris*. This species has the distinction of having been collected at the highest altitude in Colombia, at 3,250 m^[33], and in Venezuela at 3,133 m in the Páramo La Negra, Táchira State^[41].

18. *Aedes (Ochlerotatus) milleri*: Type-loc: Bogotá, Cundinamarca, Colombia (USNM). In Ecuador, this species was collected in El rio Tomebamba, Cuenca, Provincia del Azuay at 2,600 m in ponds with clear water and abundant *Spyrogirae* algae^[71]. In Colombia, 54 females were collected in Bogotá between 2,700-2,840 m in a Magoon trap and were identified as *Aedes milleri*^[51].

19. *Aedes sp.*: The immature stages of *Aedes* species are typically found in natural and artificial containers. Other typical habitats are tree holes and small amounts of water contained in dead and fallen plant parts^[72]. In Chipaque, specimens of *Aedes* species were collected in tree holes near a stream in a domestic area at 2,000 m^[33]. Recently, 30 larvae were collected from two tires (11 larvae) and a clothing washing pond (19 larvae) in Jericó in the Antioquia Department at 1,960 m. The following combination of characters were used to identify larvae of *Aedes sp.*; metathoracic pleural group of setae and siphon well developed and a single pair of seta 1-S inserted near or beyond the middle of the siphon^[17, 73].

20. *Aedes (Stegomyia) aegypti*: This species is an important vector in the transmission of dengue, yellow fever, and chikungunya viruses^[73,74]. It has not been recorded above 2,000 m in Venezuela, an altitude considered to be a theoretical barrier to the transmission of dengue virus^[41]. However, in Mexico, it was commonly encountered up to 1,700 m and there are rare records from 1,700-2,130 m^[75]. In Costa Rica, *Ae. aegypti* can be found up to 2,600 m^[76] and in Colombia the highest altitude registered was 2,200 m in Málaga, Santander^[77]. Recently, a study in the municipality of Bello in the Antioquia Department, increased the altitudinal range of *Ae. aegypti* from 2,252 to 2,302 m, previously unrecorded heights in Colombia^[10]. Notably, for the first time in Jericó, 22 specimens of *Ae. aegypti* were collected by oral aspirator (six females) and in tires (eight females and eight males) at 1,960 m. The main characters for morphological

identification are: clypeus with white scales, midfemur with an anterior white stripe from base to tip, and mesonotum with a lyre-shaped pattern of silvery scales [17].

21. *Culex* sp.: Larvae occur primarily in semi-permanent or permanent bodies of ground water, but many species are found exclusively in leaf axils, tree holes, rock-holes and crab-holes. Some species utilize artificial containers as well as the normal ground-water habitats. Several species of the subgenera *Culex* and *Melanoconion* are of medical importance [73]. Recently, three specimens identified as *Culex* species were collected at 2,862 m in the Páramo Santa Inés, Belmira [50]. In the present study, a total of 120 specimens were identified as *Culex* species collected as follows: in bromeliads at 2,092-2,481 m (23 larvae, three reared to obtain two females and one male) in Jardín; in leaf axils of *Xanthosoma* (one male) at 2,009 m; inside tires (95 larvae, 63 reared to obtain 37 females, 26 males) at 1,960 m in Jericó; and in one bromeliad at 2,642 m (eight larvae, three females and five males) in Salento.

22. *Culex (Aneodiopora) conservator*: This species is frequently found in tree holes and bamboo internodes in tropical areas far from forests [78]. Only one larva was identified as *Culex* aff. *conservator* and it was collected in a bromeliad at Jardín at 2,092 m. The diagnostic characters were lateral abdominal setae single on segments III to V [26]. Considering the single larva collected, future collections should be conducted to confirm this record.

23. *Culex* Subgenus *Carrollia*: The immature stages are found commonly in natural containers; however, some species can also be found in artificial containers. The habitats most frequently used by species of this subgenus are broken bamboo and tree holes [16, 27]. This subgenus is probably the most distinctive subgenus of *Culex* and includes the only species in the entire genus with conspicuous metallic ornamentation in the adults [27]. Species of this subgenus are not of medical importance to humans [73]. The abdomen with iridescent basolateral markings was particularly useful for the identification of two specimens (two larvae reared to obtain one female and one male) collected as larvae in the leaf axil of *Xanthosoma* at 2,100 m in Jardín.

24. *Culex (Carrollia) bihaicola*: This species utilizes an extremely wide range of aquatic habitats [27]. Some larvae of this species were collected in artificial containers in “El Chorro” at Sierra de San Luis at 1,200 m in Venezuela [79]. In Colombia, the only occurrence records published are from Anorí, Antioquia Department at 1,535 m and the Rio Raposo, Valle del Cauca Department, at low altitude from metal boxes [80]. Interestingly, specimens of *Cx. bihaicola* were collected in a palm-leaf (10 larvae reared to obtain three females) and in a tire (13 larvae, 10 reared to obtain three females and seven males) from Jardín at 2,526 m and in Salento at 2,095 m respectively. Adult characters [27]: erect scales of vertex of head yellowish to white and abdominal sterna entirely pale-scaled. Male genitalia: distal division of subapical lobe of gonocoxite relatively broad and with two specialized setae with recurved apex. Fourth-instar larvae: head seta 6-C single.

25. *Culex (Carrollia) secundus*: Larvae do not appear to occupy a wide range of aquatic habitats and have been found primarily in cut or broken bamboo, fallen leaves and palm spathes [27]. Particularly, in Colombia this species has been recorded in the Departments of Caldas, Huila, Meta, Valle del Cauca and Antioquia at elevations between 15-1,700 m [33]. In addition, there are some records of *Cx. secundus* at 1,500 m collected in fallen and broken bamboo in a forest of Manizales in the Caldas Department [33]. Recently, five specimens (five larvae reared to obtain one female and four males) were collected in one bromeliad at 2,173 m in Támenes in the Antioquia Department. Morphological characters [27]: midlobe of scutellum with linear dark scales; mesonotal vestiture predominantly dark bronzy; male with a single pair of long subapical; maxillary palpus of male entirely dark-scaled.

26. *Culex* Subgenus *Culex*: Specimens of this subgenus were collected in bromeliads in the coffee plantation “Finca La Esperanza”, Iles municipality on the road between Pasto and Ipiales at 1,900 m [33]. Recently, *Culex stenolepis* (Dyar & Knab 1908) was the first species found in a ground pool within, and downslope from, the crater of the Pululahua Volcano at 2,101 m, 80 km from the capital Quito, in Ecuador [81]. In Colombia, the maximum altitude recorded for this species is in Bogotá at 3,150 m [33] and in Venezuela, six species belonging this subgenus were reported above 2,000 m [41]. In the present study, specimens were identified principally by the presence/absence of a few salient anatomical features of the adults based on characters available in Forattini 2002 [16]. A total of 17 specimens belonging this subgenus were identified as *Cx. aff. habilitator*. They were collected in bromeliads at 2,092 m (three larvae) and 2,416 m (17 larvae, five reared to obtain two females and three males) in Jardín and Salento respectively. In addition, six species were identified as species 1, 3-7. Further studies are necessary each species the exact taxonomic status assignment of each species.

27. *Culex (Culex) acharistus*: Eighty-four larvae, 75 reared to obtain 40 females and 35 males, were morphologically identified as *Cx. acharistus* and were collected exclusively from cattle footprints between 2,576-2,642 m in Salento. The main morphological characters for larvae, adult females and male genitalia are based on the description of this species provided by Forattini 2002 [16].

28. *Culex (Culex) coronator*: In Brazil, Saint Louis encephalitis virus has been isolated from *Cx. coronator* [82] and in Florida, USA, this species is a competent vector of West Nile virus under certain conditions, such as high temperatures [83]. Most recently, 15 specimens were identified as *Cx. coronator* collected from one bromeliad (one female) and an animal drinking bowl (14 larvae, five reared to obtain three females and two males) at 2,092 m in Jardín. The main character in larvae was the siphon with strong apical spines. This species differs from other members of the Coronator Complex by the arrangement and number of setae on the subapical lobe of the gonocoxite in the male genitalia [25].

29. *Culex (Culex) chitae*: Type-loc: Monserrate, nr. Bogota, Colombia (USNM). The only information about this species is that two males were collected in the type locality at 2,900 m. Adult female, larval and pupal characters are unknown [84].

30. *Culex (Culex) quinquefasciatus*: This species is recorded above 2,000 m from various municipalities of the Cundinamarca Department [9, 85-87]. *Culex quinquefasciatus* is an urban problem with health importance in Bogotá and its surroundings [88]. In its natural environment, larvae develop in polluted ponds rich in organic matter [86, 89]. In the list of mosquitoes above 2,000 m in Venezuela, two records exist for this species at 2,000 and 2,327 m [41]. A total of 119 specimens *Cx. quinquefasciatus* were collected in bromeliads (84 larvae, 46 reared to obtain 17 females and 29 males) and one tire (35 larvae, 29 reared to obtain nine females and 20 males) in Jardín at 2,092-2,317 m and one tire in Salento at 2,019 m.

31. *Culex* Subgenus *Microculex*: The immature stages inhabit mainly epiphytic bromeliads. Moreover, some specimens have also been found less frequently in tree holes and bamboo internodes. Species of this subgenus are not of medical importance to humans [16, 73]. *Culex (Microculex) daumastocampa* Dyar & Knab, 1908 was reported at 2,550 m in Venezuela [41]. The subgenus *Microculex* includes 33 species [73] and currently no attempt has been made to develop a taxonomic key for all species [90]. Specimens of this subgenus were collected in Jardín between 2,261-2,403 m (17 larvae, 11 reared to obtain five females and six males) and in Yarumal (three larvae) at 2,800 m.

32. *Culex (Microculex) aureus*: In the present study, we collected 21 specimens (21 larvae, nine reared to obtain seven females and two males) identified as *Cx. aureus* in bromeliads at 2,095 m in Salento. The morphological characters are available for the identification of the pupa, larva and adult male [91]. This is the first record of this species in Colombia.

33. *Culex (Microculex) imitator*: The larval habitat for this species is exclusively bromeliads [92, 93]. We identified 20 specimens as probable *Cx. imitator* using molecular taxonomy [94]. In the Páramo de Santa Inés, Belmira, one female reared from a larva collected in a bromeliad at 2,862 m [50, 94]. The other 19 were larvae collected in bromeliads at 2,481 m in Jardín. These are potential records as the species was not definitively identified.

34. *Culex* Subgenus *Neoculex*: Species of this subgenus are not known to be of medical or economic importance [73]. In Suba in the Cundinamarca Department, specimens collected at 2,580 m were identified belonging this subgenus as species 60 [33]. In the present study, one specimen of this subgenus was collected in a pond in the Parque Ecoturístico Arvi, Santa Elena, Medellín in the Antioquia Department at 2,600 m. Considering that only one specimen was collected, future collections should be conducted to expand and identify the species.

3.5 *Orthopodomyia* sp.: Most species of this genus occur in the Neotropical and Oriental regions. Recently, in Colombia, *Orthopodomyia albicosta* (Lutz, 1905)

was collected in areas with coffee plantations in Hispania in the Antioquia Department at 1,045 m and Anserma in the Caldas Department at 875 m [95]. In the present study, for the first time in Salento, three larvae reared to males were identified as *Orthopodomyia* species and were collected in bromeliads at 2,642 m. Little is known about the biology of *Orthopodomyia* and none of the species are of medical or economic importance to humans [73].

36. *Johnbelkinia* sp.: Species of *Johnbelkinia* are considered to be potential vectors of pathogens of human diseases. [73]. Recently, specimens of *Johnbelkinia ulopus* (Dyar & Knab, 1906) were collected in the north of the Colombian Andes between 848-1,751 m [11]. In addition, two females were identified as *Johnbelkinia* sp. and were collected by oral aspirator at 2,100 m in Jardín. Both specimens were identified using the following combination of characters: “dorsal head scales with brilliant silver and blue reflections, proboscis distinctly longer than forefemur, scutal scales moderately broad and flat and dull to moderately iridescent, postpronotum with one or two posterior setae, lower mesokatepisternal setae usually not extended above lower edge of mesepimeron and mid- and hindtarsi with pale markings” [28].

37. *Sabethes* sp.: Species of this genus are forest mosquitoes and some species are of medical importance to humans [73]. Recently, *Sabethes (Sabethinus) intermedius* (Lutz, 1904) and *Sabethes (Peytonulus) soperi* Lane & Cerqueira, 1942 were collected in the province of Napo, Ecuador in the Natural Reserve of Colonso-Chalupas at 1,200 m altitude [96]. In the current study, four females of a *Sabethes* species were collected by oral aspirator at 2,100 in Jardín. The morphological characters of all specimens were: “pronotal lobe quite developed and united above; postnotum developed and nearly perpendicular to the axis of scutellum; prealar setae absent; mosquitoes with shining metallic scales” [17].

38. *Sabethes* subgenus *Sabethoides*: In Jardín, four females of this subgenus were reared from larvae obtained from bromeliads at 2,403 m [11].

39. *Shannoniana fluviatilis*: In Jardín, one female was collected by insect net at 2,253 m [11].

40. *Trichoprosopon* sp.: Species of this genus are basically forest mosquitoes, the larvae of which are found in a variety of habitats: bamboo, cacao pods, coconut shells, flower bracts of heliconians, leaf axils of plants, tree holes and artificial containers. *Trichoprosopon digitatum* (Rondani, 1848) is regarded as a potential vector of arboviruses to humans [73]. In the present study, 72 specimens were identified as species of *Trichoprosopon*, two females were collected by oral aspirator at 2,253 m in Jardín, 52 larvae in bamboo stumps (45 reared to obtain 31 females and 14 males) between 2,002-2,200 m, three larvae in one bromeliad (reared to obtain two females and one male) at 2,009 m, 14L in the leaf base of a *Xanthosoma* between 2,002-2,009 m in Jericó and one larvae in a bamboo stump at 2,471 m in Salento. Molecular identification tools will be used to aid the identification of these specimens because it was not possible to identify them to species based on morphology.

41. *Trichoprosopon evansae*: Type-loc: Restrepo, Meta, Colombia (IOC). In Jardín, one male and six females were obtained by different collecting methods in a forest habitat between 2,253-2,413 m ^[11]. In addition, one female was identified as *Tr. evansae*, which was collected at 2,253 m by entomological net in Jardín. Future collections should be conducted to expand this record.

42. *Trichoprosopon pallidiventer* s.l.: In 13 localities from northern Andean coffee-growing regions of Colombia, 346 males and 416 females were obtained by different collecting methods between 798-2,515 m ^[11]. In the current study, 11 larvae of this species were collected in a bamboo stump (five reared to obtain two females and three males) and bromeliads (six reared to obtain three females and three males) at 2,642 m in Salento. The specimens were identified using available morphological keys ^[17, 28]. These specimens belong to the Pallidiventer Complex of Zavortink (1981) which includes unknown species ^[11].

43. *Trichoprosopon* sp.: A. This morphospecies was tentatively identified among 28 females from a high valley area of Jardín municipality, part of the Colombian coffee growing region. The habitat is a cloud forest at an elevation of 2,253 m with numerous bromeliads and other epiphytes. Mosquitoes were attracted to humans during the day and they were collected using a mouth aspirator. Morphologically, these specimens seem to belong to the *Trichoprosopon pallidiventer* Complex ^[11].

44. *Trichoprosopon* sp. B: This morphospecies was found at 2,202 m in a Colombian Andean region. The mosquitoes were tentatively identified from three reared adult females obtained from larvae and pupae inhabiting a *Xanthosoma* spp. leaf base. The plants were in a small vegetation patch above the border of a road in the rural municipality of Jericó. This species is similar to species belonging to the genus *Johnbelkinia* but there are some morphological differences, especially in the pleural setae, allowing for the recognition of *Trichoprosopon* sp. B as part of the genus *Trichoprosopon* ^[11].

45. *Wyeomyia* sp: Species of this genus are not known as vectors of disease agents and have little or no economic importance to humans ^[73]. In the Páramo de Santa Inés, Belmira, eight females were collected by entomological nets at 2,977 m ^[50]. In the present study, 74 specimens were identified as *Wyeomyia* sp. In Jardín, five larvae (two reared to obtain two females) were collected in bromeliads between 2,092-2,526; two females were collected by entomological net at 2,253 m; three females by oral aspirator between 2,100-2,253 m; and one female by Shannon trap at 2,403 m. In Jericó, three larvae (reared to obtain three females) were collected from one bromeliad at 2,200 m and 51 larvae (reared to obtain 43 females and 8 males) in bromeliads at 2,018 m. For Salento, six larvae (reared to obtain four females and two males) were collected in bromeliads at 2,642 m. Finally, three larvae (one reared to obtain one female) were collected in Yarumal at 2,800 m. Molecular identification will be used in this case because most of the material consists of larvae and adult females, and this group is taxonomically difficult with morphologically similar species that require revision ^[73].

46. *Wyeomyia* aff. *phroso*: Recently, this species was collected in the adult stage in the forest habitat of three municipalities of the northern Andean coffee-growing regions of Colombia, in Jardín (Antioquia Department) and Anserma and Chinchiná (Caldas Department) between 1,313-2,253 m ^[11].

47. *Wyeomyia* (*Nunezia*): The subgenus *Nunezia* has not been well characterized, but the species possess significant differences from specimens ^[31]. Recently, *Wy. bicornis* was recorded at 2,550 m in Venezuela ^[41]. An undescribed species, consisting of 101 adult females and eight males, is known to occur in Jardín at 1,313 and in Chinchiná at 2,247 m ^[11]. Seven larvae of this subgenus were collected in bromeliads between 2,317-2,526 m in Jardín. Some characters of the of the females reared from the larvae were curved proboscis similar in length to the forefemur, antennal flagellum about 0.6 length of the proboscis, frequent presence of silvery scales on the scutellum, and other characters provided in Porter 2014 ^[31].

48. *Wyeomyia* (*Nunezia*) sp.: A. Records correspond to three males reared from larvae collected in bromeliads in forest habitat in Chinchiná (1,514 m) and Jardín (2,247 m), mentioned above ^[11].

49. *Wyeomyia* (*Nunezia*) sp.: B. In Jardín, this species was provisionally identified from two males reared from larvae collected in a bromeliad forest at 2,316 m ^[11].

50. *Uranotaenia* Subgenus *Uranotaenia*: In Bogotá, specimens collected at 2,550 m were identified belonging to this subgenus as species 4 ^[33].

51. *Uranotaenia* (*Uranotaenia*) *riverai*. Type-loc: Bogotá, Colombia (USNM). This species was described from two males and two females collected in Bogotá at 2,700 m. The larva and pupa are unknown ^[97].

Table 1: Mosquito species recorded above 2,000 m in Colombia.

# Taxon	Reference	Municipality/Neighborhood	Department	Coordinates	Collecting method	Altitude
19	[33]	Chipaque	Cundinamarca	04°26'33"N, 74°02'39"W	Seepage/tree holes/ground pool	2,000
40	Present study	Jericó/ Quebrada cerca al casco urbano	Antioquia	05°47'18"N, 75°47'26"W	Bamboo stump/ Leaf axils of <i>Xanthosoma</i>	2,002
1, 4	[40]	Villa Maria	Caldas	05°02'44"N, 75°30'55"W	Not reported	2,005
21 / 40	Present study	Jericó/ Quebrada cerca al casco urbano	Antioquia	05°47'17"N, 75°47'27"W	Leaf axils of <i>Xanthosoma</i> / Bromeliad	2,009
45	Present study	Jericó/Reserva la Cascada	Antioquia	05°47'50"N, 75°46'49"W	Bromeliad	2,018
30	Present study	Salento	Quindio	04°38'14"N, 75°34'15"W	Tire	2,019
6, 21, 22, 26, 30, 45 / 28 // 30	Present study	Jardín/Forest	Antioquia	05°37'18"N, 75°49'35"W	Bromeliad /Animal drinking bowl // Tire	2,092
24 / 32	Present study	Salento	Quindio	04°37'50"N, 75°28'08"W	Tire / Bromeliad	2,095
2, 6, 7, 12, 36, 37, 45 / 12 //23	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'03"N, 75°46'02"W	Oral aspirator / rock pool // Leaf axils of <i>Xanthosoma</i>	2,100
4	[40]	Santuario	Antioquia	06°08'15"N, 75°15'50"W	Not reported	2,150
1, 4	[40]	Manizales	Caldas	05°03'58"N, 72°29'05"W	Not reported	2,153
6, 25	Present study	Támesis	Antioquia	05°43'19"N, 75°44'45"W	Bromeliad	2,173
40, 45	Present study	Jericó/Río Frío	Antioquia	05°43'19"N, 75°44'45"W	Bromeliad / Bamboo stump	2,200
44	[11]	Jericó	Antioquia	05°43'19"N, 75°44'45"W	Leaf axils of <i>Xanthosoma</i>	2,202
20	[77]	Málaga	Santander	06°41'58"N, 72°43'58"W	Not reported	2,200
4	[40]	Aguadas	Caldas	05°36'33"N, 75°27'23"W	Not reported	2,214
30	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'51"N, 75°47'40"W	Bromeliad	2,230
6	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°36'49"N, 75°48'57"W	Entomological nets, bromeliads	2,251
47, 48	[11]	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°36'49"N, 75°48'57"W	Bromeliad	2,247
20	[10]	Bello/Vereda Tierradentro, zona rural	Antioquia	06°19'55"N, 75°33'29"W	Ovitrap	2,252
39, 41, 43, 46/ 40, 41, 45	[11] / Present study	Jardín/Forest	Antioquia	05°35'54"N, 75°49'11"W	Insect net	2,253
31	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'52"N, 75°47'40"W	Bromeliad	2,261
26, 30	[33]	Santa Leticia	Huila	02°14'25"N, 76°10'12"W	Swamp	2,300
20	[10]	Bello/Vereda Tierradentro, zona rural	Antioquia	06°19'55"N, 75°33'29"W	Ovitrap	2,302
49	[11]	Jardín/Forest	Antioquia	05°35'52"N, 75°47'39"W	Bromeliad	2,316
30, 47	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'13"N, 75°46'18"W	Bromeliad	2,317
6	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'03"N, 75°46'02"W	Shannon trap	2,376
15	[21, 33]	Soacha/Ogamora town	Cundinamarca	04°34'41"N, 74°12'52"W	Volcanic rockhole in pasture	2,400
2	[49]	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'03"N, 75°46'02"W	Shannon trap	2,400
2, 6, 31, 45 / 38	Present study / [11]	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°37'59"N, 75°49'48"W	Shannon trap, bromeliad	2,403
6	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°37'59"N, 75°49'48"W	Bromeliad	2,412
41	[11]	Jardín	Antioquia	05°36'49"N, 75°48'57"W	Bromeliad, <i>Xanthosoma</i> spp. leaf base,	2,413
26	Present study	Salento	Quindio	04°38'06"N, 75°28'58"W	Bromeliad	2,416
40	Present study	Salento	Quindio	04°37'50"N, 75°28'08"W	Bamboo stump	2,471
21, 33	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'03"N, 75°46'02"W	Bromeliad	2,481
42	[11]	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	04°37'50"N, 75°28'08"W	Insect net, bromeliad, <i>Xanthosoma</i> spp. leaf base	2,515
26	Present study	Salento	Quindio	04°37'50"N, 75°28'08"W	Bamboo stump/ <i>Xanthosoma</i> spp. leaf base	2,515
2, 6	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'03"N, 75°46'02"W	Bromeliad	2,521
24 / 45, 47	Present study	Jardín/Reserva forestal La Playa	Antioquia	05°35'13"N, 75°46'18"W	Palm-leaf / Bromeliad	2,526
30	[85]	Bogotá/ Río Tunjuelito	Cundinamarca	04°32'43"N, 74°07'32"W	Shannon trap	2,540

30	[86]	Mosquera/Centro Agropecuario Marengo	Cundinamarca	04°42'00"N, 74°14'00"W	Aspirator, artificial containers, Shannon trap	2,543
50	[33]	Bogotá/Canal del Rio Negro	Cundinamarca	04°35'56"N, 74°4'51"W	Swamp/seepage	2,550
30	[33]	Bogotá/Ciudad Universitaria	Cundinamarca	04°38'08"N, 74°04'58"W	Ground pool	2,555
26	[33]	Soacha/Chusacá town	Cundinamarca	04°33'00"N, 75°15'00"W	Swamp	2,570
27	Present study	Salento	Quindio	04°37'50"N, 75°28'08"W	Cattle footprint	2,576
10, 16, 34	[20, 21, 33]	Bogotá/Suba	Cundinamarca	04°44'28"N, 74°05'02"W	Bromeliad	2,580
30	[87]	Bogotá/Urban area	Cundinamarca	04°36'43"N, 74°04'07"W	Not reported	2,600
26	[33]	Tangua/Vereda El Cebadal	Nariño	01°05'44"N, 77°23'38"W	Ground pool	2,600
17, 33	[33]	Sopó	Cundinamarca	04°54'29"N, 73°56'25"W	Pond	2,600
2	[48]	Angelopolis/Reserva Ecológica	Antioquia	06°06'47"N, 75°43'01"W	Bromeliad	2,600
34	Present study	Medellín/ Parque Ecoturístico Arví	Antioquia	05°15'56"N, 75°29'49"W	Pond	2,600
15	[21, 33]	Usaquen/Las Acacias	Cundinamarca	04°43'11"N, 74°02'12"W	Small ground pool in garden lawn	2,640
21, 35, 42, 45/ 26 // 42	Present study	Salento	Quindio	04°37'50"N, 75°28'08"W	Bromeliad/ Cattle footprint // Bamboo stump	2,642
10-12	[20, 33]	Bogotá	Cundinamarca	04°44'28"N, 74°05'02"W	Bromeliad	2,650
15	[21]	Bogotá/Usaquen, Las Acacias	Cundinamarca	04°41'20"N, 74°01'31"W	Ground pool	2,690
3, 13, 17, 18 / 51	[51]/[97]	Bogotá	Cundinamarca	04°35'56"N, 74°04'51"W	Ground pool / Magoon trap	2,700
6	Present study	Angelopolis/El Romeral	Antioquia	06°05'30"N, 75°44'05"W	Bromeliad	2,704
6-8, 12	[50]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°37'22"N, 75°39'19"W	Bromeliad	2,734
2, 6	Present study	Yarumal/La Maconia	Antioquia	06°57'48"N, 75°25'02"W	Bromeliads	2,755
12	Present study	Yarumal/La Maconia	Antioquia	06°57'48"N, 75°25'02"W	Artificial container	2,799
4	[33]	Pasto/Laguna de la Cocha	Nariño	01°16'00"N, 77°09'07"W	Swamp	2,800
31, 45	Present study	Yarumal/La Maconia	Antioquia	06°57'48"N, 75°25'02"W	Bromeliad	2,800
6, 7	Present study	Angelopolis/ El Romeral	Antioquia	06°07'55"N, 75°45'45"W	Bromeliad	2,802
3, 17, 18	[51]	Bogotá/Rio San Francisco	Cundinamarca	04°35'01"N, 74°02'25"W	Ground pool / Magoon trap	2,840
3, 8, 14, 21 / 33	[50]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°37'10"N, 75°39'26"W	CDC trap, oral aspirator /bromeliads	2,862
29	[84]	Bogotá/Cerro de Monserrate	Cundinamarca	04°36'21"N, 74°03'23"W	Aspirator/stream pool	2,900
6, 9	[50]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°38'44"N, 75°42'16"W	Oral aspirator, bromeliad	2,905
32	Present study	Salento	Quindio	04°37'50"N, 75°28'08"W	Bromeliad	2,905
6	[50]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°38'44"N, 75°42'16"W	Oral aspirator	2,928
2, 45	[50]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°37'30"N, 75°42'25"W	Entomological nets, bromeliads	2,977
6, 9	[50]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°38'40"N, 75°42'23"W	Oral aspirator, bromeliad	3,000
5	[60]	Chocontá	Cundinamarca	05°01'00"N, 73°42'00"W	Bromeliad	3,000
6, 7	[50]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°38'48"N, 75°42'35"W	Oral aspirator, CDC trap, bromeliad	3,098
5	[61]	Guasca	Cundinamarca	04°46'00"N, 74°10'00"W	Bromeliad	3,100
9	[20, 33]	Puracé/Parque Nacional Natural Puracé	Huila	02°12'00"N, 76°21'00"W	Bromeliad, Human Landing Catch	3,100
3	[22]	Túquerres	Nariño	01°05'14"N, 77°37'08"W	Not reported	3,104
26	[33]	Bogotá/Rio San Francisco	Cundinamarca	04°35'01"N, 74°02'25"W	Stream pool	3,150
13,17,18,21/ 9,12, 33	[51] / [20], [33]	Bogotá/Rio San Francisco	Cundinamarca	04°35'01"N, 74°02'25"W	Magoon trap/Bromeliad/Stream pool/Pond	3,186
17	[70]	Páramo de Santa Inés, Belmira	Antioquia	06°36'18"N, 75°39'57"W	CDC light trap	3,200
17	[33]	Choachí	Cundinamarca	04°32'00"N, 73°56'00"W	Ground pool	3,250

4. Discussion

This paper provides the most complete, up-to-date list of mosquito species known to occur above 2,000 m in Colombia, with a total of at least 35 species belonging to 11 genera and 15 subgenera according to the latest nomenclature and classification. The occurrence of some species mentioned only from their type locality in Colombia, for example, *An. oikitorakras*, *Ae. (How.) marinkellei*, *Ae. (Och.) bogotanus*, *Ae. (Och.) deficiens*, *Cx. chitae* and *Ur. riverai*, constitutes valuable information for overall country diversity. Twelve records, *An. (Kerteszia)* sp. Boliviensis Group, *Ae. (How.) Eleanorae* Group, *Ae. (How.) marinkellei/osornoi* hybrid, *Ae. (How.) quadrivittatus*, *Cx. (Microculex) aureus*, a species of *Culex* subgenus *Neoculex*, *Trichoprosopon* sp. A, *Trichoprosopon* sp. B, *Wy. aff. phroso*, *Wy. (Nuz) sp. A*, *Wy. (Nuz) sp. B* and a species of *Wy.* subgenus *Nunezia*, were not included in a recent publication about mosquitoes of Colombia [98]. For *Trichoprosopon* this is probably because the study with the most recent new records for the tribe Sabethini is was published the same year [11]. About the species of the *An. (Kerteszia)* Boliviensis Group, the records for Colombia are recent [48–50, 94]. The taxonomic information for *An. boliviensis* is incomplete due to the absence of descriptions of the immature stages and adult male. Moreover, using the latest taxonomic key to adult females, it is possible to identify this species only as a member of the Boliviensis Group because of the high similarity of morphological characters. Given the incomplete information on species in this group and their taxonomic status, additional investigation is highly desirable [48, 49].

Species of subgenus *Lophopodomyia* of the genus *Anopheles* have not been studied in detail. These are forest mosquitoes and little is known about their bionomics. Even though species of this subgenus are not of medical importance to humans, adult females are apparently active during twilight periods and will feed on humans and other animals that enter their realm [73]. For *An. pseudopunctipennis* (subgenus *Anopheles*) and *An. argyritarsis* (subgenus *Nyssorhynchus*) some authors describe a strong association between them because the species co-occur, although in different proportions, in the same larval habitats at < 1,000 m [99–102]. In Bolivia, both species were found above 2,000 m, which is considered to be “of mid-range altitude” compared with the other *Anopheles* species. The minimum and maximum altitudes are 206 and 2,732 m for *An. pseudopunctipennis* and 348 m and 2,323 m for *An. argyritarsis* [37].

In general, *Anopheles* species present in high mountain ecosystems of Colombia are not significant vectors, however, above 1,000 m *An. pseudopunctipennis* is the only species considered to be a malaria vector and has priority in control efforts in Bolivia [37]. Moreover, *Anopheles (Nyssorhynchus) albimanus* (Wiedemann, 1820), one of the most important vectors of human malaria in Colombia [38,39,103] is typically found in coastal land below 500 m; nevertheless, an earlier report indicated its presence at 1,941 m in Morelia, Mexico [104]. Furthermore, highland expansion of *An. albimanus* has been demonstrated in Ecuador, up to 1,541 m [105]. For countries in Mesoamerica and the Caribbean, near present and future climate data suggest that *An. albimanus* is likely to invade high-altitude areas (>2,000 m) by 2080 as a result of global warming [106].

Remarkably, species belonging to some genera of the tribe Aedini have not been well studied. Therefore, it is presumed that additional species could occur above 2,000 m in Colombia. In Ecuador, the *Ae. (How.)* species are reported mainly from the Andean highlands. Recently *Aedes (Howardina) fulvithorax* (Lutz, 1904) was found in bromeliads in a small town at 1,475 m in Napo Province [96]. Some species of this subgenus attack humans readily and are very abundant [20]. Isolation of an unidentified virus was reported for *Aedes (Howardina)* sp. [62]. Another important subgenus of *Aedes* is *Ochlerotatus*, which includes species apparently endemic to the Colombian Andes and are relatively poorly known [21]. *Aedes (Och.) euiris* is the mosquito with the maximum altitude (3,250 m) in Colombia [33] and in Venezuela (3,133 m) [41]. The best studied aedine species is *Ae. aegypti*, which occurs up to 2,302 m in Colombia [10], up to 2,130 m in Mexico [75] and up to 2,600 m in Costa Rica [76]. Moreover, some studies have suggested that the geographic range of *Ae. aegypti* could be increasing due to climate warming [107]. A more thorough investigation of distribution at high altitudes and the role of these aedine species as vectors of arboviruses should be conducted. This is especially pertinent in Colombia, due to the presence of *Ae. aegypti* at 1,960 m in Jericó and up to 2,302 m in Tierradentro, Bello and positive dengue infections in specimens collected in the Paris neighborhood of Bello at 1,984 m [10].

The genus *Culex* is the second largest genus of the family Culicidae after genus *Aedes*. It has a cosmopolitan distribution with 768 formally recognized species divided into 26 subgenera. In the Americas members of this extensive genus are subdivided into 14 subgenera [90]. The subgenera *Culex* and *Melanoconion* are the most important because of their abundance, diversity and epidemiological importance [16]. Above 2,000 m, species of three subgenera, *Culex*, *Neoculex* and *Microculex*, are present in Colombia. Altitude does not seem to limit the distribution of *Cx. quinquefasciatus*, since it has been found commonly in municipalities of the Cundinamarca Department between 2,540–2,600 m [9, 33, 85–87]. *Culex quinquefasciatus* is a competent vector of filarial infections, West Nile virus and St. Louis encephalitis virus. Although recent studies have demonstrated the circulation of West Nile virus in Colombia [108, 109], this species has not yet been implicated as a vector in this country [74].

Finally, species from the subgenus *Uranotaenia* of the genus *Uranotaenia* are not of medical or economic importance but adult females of some species are known to feed on frogs, birds and mammals [73]. For the tribe Sabethini, an important study was undertaken in 17 representative municipalities of the northern Andes in Colombia, the most important coffee-growing region in the country recorded 10 species above 2,000 m. However, in some cases it was not possible to identify some specimens to species. Many of these species exhibited close similarity to described species but possessed morphological differences that require direct comparison with type material [11]. In general, this tribe has not been well studied, and additional and/or undiscovered species may occur over 2,000 m in Colombia. The mosquito fauna and their ecology above 2,000 m in Colombia requires more research, and we consider that the findings reported here to be a good starting point.

5. Conclusion

A total of 35 species of mosquitoes are reported from high Andean mountain ecosystems in Colombia with at least five of medical importance. The presence of these species along with epidemiological data are part of the baseline data for surveillance programs. Some species of the subgenera *Howardina* are reported for the first time from this area. This is a taxonomic complex group that deserve more detailed studies. The annotated list of mosquitoes given in this study is the most complete one for mosquitoes collected above 2,000 m in the country.

6. Acknowledgements

DRG received financial support for her doctoral studies from the Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias, Colombia, Convocatoria 528-2011.

7. References

- WRBU. Systematic catalog of Culicidae. Walter Reed Biosystematics Unit. <http://www.mosquitocatalog.org>. 17 March, 2017.
- Bueno R, Chordá F, Bernúes A, Jiménez R. Aportaciones al conocimiento de los mosquitos (Diptera, Culicidae) de alta montaña presentes en la península ibérica. *Pirineos*. 2009; 164:49-68.
- Amat G. Artropofauna del Parque Nacional Natural Chingaza. *Univ Javeriana Cuad Divulg*, 1991; 14:1-12.
- Amat G, Vargas O. Caracterización de microhábitats de la artropofauna en páramos del Parque Nacional Natural Chingaza Cundinamarca, Colombia. *Caldasia*. 1991; 16(79):539-50.
- Morales-Castaño I, Amat GG. Diversidad de la artropofauna terrestre del páramo la Parada del viento, cordillera oriental, Cundinamarca, Colombia. *Boletín la Soc Entomológica Aragon*. 2012; 51:211-216.
- Sturm H, Abouchaar A. Observaciones sobre la ecología del páramo andino de Monserrate. *Caldasia*. 1981; 13(62):223-56.
- Botero R. Insectos de los páramos: maravillas en la coevolución entre plantas y animales. *Bol Cult Bibliogr*, 1986; 23(8):1-11.
- Chaves-Forero A, Duarte-Gómez H, Zenner de Polanía I. Entomofaunal comparison under three landscape conditions at the Cerro de Juaica (Tenjo, Cundinamarca). *Rev UDCA Actual Divulg Científica*, 2015; 18(1):127-36.
- García C, Escovar J, Londoño Y, Moncada L. Altitud y tablas de vida de poblaciones de *Culex quinquefasciatus* (Diptera Cucilidae). *Rev Colomb Entomol*, 2010; 36(1):62-7.
- Ruiz-López F, González-Mazo A, Vélez-Mira A, Gómez G, Zuleta L, Uribe S *et al*. Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica*, 2016; 36:303-8.
- Suaza-Vasco J, López-Rubio A, Galeano J, Uribe S, Vélez I, Porter C. The sabethines of Northern Andean coffee-growing regions of Colombia. *J Am Mosq Control Assoc*. 2015; 31(2):125-134.
- Obrist MK, Duelli P. Rapid biodiversity assessment of arthropods for monitoring average local species richness and related ecosystem services. *Biodivers Conserv*, 2010; 19(8):2201-20.
- Ward DF, Larivière MC. Terrestrial invertebrate surveys and rapid biodiversity assessment in New Zealand: Lessons from Australia. *N Z J Ecol*, 2004; 28(1):151-9.
- Kerr J, Sugar A, Packer L. Indicator taxa, rapid biodiversity assessment, and nestedness in an endangered ecosystem. *Conserv Biol*. 2000; 14(6):1726-34.
- Pecor J, Gaffigan T. Collecting, rearing, preserving, mounting and shipping techniques for mosquitoes. Washington, DC: Walter Reed Biosystematics Unit. <http://wrbu.si.edu/Techniques.html>. 2017.
- Forattini O. *Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia*. São Paulo, Editora Universidade de São Paulo, 2002; II:860.
- Lane J. *Neotropical Culicidae*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1953; II:565.
- Mattingly P. Illustrated keys to the genera of mosquitoes. *Contrib Am Entomol Inst*. 1971; 7(4):1-84.
- Clark S, Darsie R. The mosquitoes of Guatemala: Their identification, distribution and bionomics. *Mosq Syst*. 1983; 15(3):151-206.
- Berlin O. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XII. A revision of the Neotropical subgenus *Howardina* [sic] of *Aedes* [sic]. *Contrib Am Entomol Inst (Ann Arbor)*, 1969; 4(2):1-190.
- Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIII. A revision of the Scapularis group of *Aedes (Ochlerotatus)*. *Contrib Am Entomol Inst*. 1976; 13(3):1-143.
- González R, Carrejo N. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: claves y notas de distribución. Edn 2, Programa Editorial Universidad de Valle, Cali, 2009, 209.
- Harrison B, Ruiz-lopez F, Falero G, Savage H, Pecor J, Wilkerson R. *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*, 2012; 3218:1-17.
- Zavortink T. Mosquito Studies (Diptera, Culicidae). XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. *Contrib Am Entomol Inst (Ann Arbor)*, 1973; 9:1-54.
- Bram RA. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera, Culicidae). *Proc United States Natl Museum Arch*, 1967; 120:1-122.
- Dyar H, Knab F. The larvae of Culicidae classified as independent organisms. *J New York Entomol Soc*. 1906; 14(4):169-230.
- Valencia J. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXI. A revision of the subgenus *Carrollia* of *Culex*. *Contrib Am Entomol Inst*. 1973; 9(4):1-134.
- Zavortink T. The new *Sabethine* genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. *Contrib Am Entomol Inst*. 1979; 17:1-61.
- Stone A. Notes on the genus *Trichoprosopon* (Diptera, Culicidae). *Rev Entomol*. 1944; 15:335-341.
- Judd DD. Review of a bromeliad-ovipositing lineage in *Wyeomyia* and the resurrection of *Hystatomyia* (Diptera: Culicidae). *Ann Entomol Soc Am* 1998; 91(5):572-89.
- Porter C. *Wyeomyia (Nunezia) paucartamboensis*, a new species of Sabethini (Diptera: Culicidae) from the Peruvian Andes with a diagnosis of the subgenus

- Nunezia*. Proc Entomol Soc Washingt, 2014; 116(3):311-38.
32. Wilkerson R, Linton Y, Fonseca D, Schultz T, Price D, Strickman D. Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of Tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. PLoS One. 2015; 10(7):e0133602.
 33. Heinemann S, Belkin J. Collection records of the project Mosquitoes of Middle America. 12. Colombia (COA, COB, COL, COM). Mosq Syst, 1978; 10(4):493-539.
 34. Dantur-Juri MJ, Zaidenberg M, Claps GL, Santana M, Almiron WR. Malaria transmission in two localities in north-western Argentina. Malar J. 2009; 8:18.
 35. Lardeux F, Tejerina R, Aliaga C, Ursic-Bedoya R, Lowenberger C, Chavez T. Optimization of a semi-nested multiplex PCR to identify *Plasmodium* parasites in wild-caught *Anopheles* in Bolivia, and its application to field epidemiological studies. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008; 102(5):485-92.
 36. Zimmerman RH. Ecology of malaria vectors in the Americas and future direction. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1992; 87(3):371-83.
 37. Lardeux F, Aliaga C, Tejerina R, Torrez L. Comparison of transmission parameters between *Anopheles argyritarsis* and *Anopheles pseudopunctipennis* in two ecologically different localities of Bolivia. Malar J. 2013; 12(1):282.
 38. Montoya-Lerma J, Solarte Y, Giraldo-Calderón G, Quiñones M, Ruiz-López F, Wilkerson R *et al*. Malaria vector species in Colombia - A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106(1):223-238.
 39. Olano V, Brochero H, Saenz R, Quiñones M, Molina J. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomedica, 2001; 21:402-8.
 40. Galvis AG. Biología y distribución geográfica de los anofelinos en Colombia. Reimpr la Rev la Fac Med Editor Cromos, Bogotá. 1943; XII(2):5-55.
 41. Navarro J, Del Ventura F, Zorrilla A, Liria J. Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. Rev Biol Trop, 2010; 58:245-54.
 42. Navarro J, Liria J, Piñango H, Barrera R. Biogeographic area relationships in Venezuela: a parsimony analysis of Culicidae-phytotelmata relationships distributions in National Parks. Zootaxa, 2007; 1547:1-19.
 43. Prado M. Caracterización morfológica y molecular de tres especies del subgénero *Kerteszia* de *Anopheles* (Diptera: Culicidae) en la región andina venezolana. Trabajo Especial de Grado, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, 2003, 53.
 44. Collucci E, Sallum M. Phylogenetic analysis of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles* (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological characters. Insect Syst Evol. 2003; 34(4):361-72.
 45. Quiñones ML, Suarez MF, Rodriguez A, Fleming G, Galvis LE. Comportamiento de *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* Zavortink, 1973 y su incriminación como posible vector de malaria en el departamento del Tolima, Colombia. Biomedica, 1984; 4(1):5-13.
 46. Roca-García M. The isolation of three neurotropic viruses from forest mosquitoes in eastern Colombia. J Infect Dis. 1944; 75(2):160-9.
 47. Bates M. Mosquitoes as vectors of Dermatobia in Eastern Colombia. Ecology. 1944; 25(2):159-70.
 48. Suaza-Vasco J, Ruiz-Molina N, Galeano E, Lopez A, Uribe S, Porter C. Evidencia molecular de presencia de *Anopheles (Kerteszia)* Grupo Boliviensis (Diptera: Culicidae) en reserva ecológica Alto Romeral departamento de Antioquia, Colombia. Entomotropica, 2013; 28(2):160.
 49. Suaza-Vasco J, Ruiz-Molina N, Uribe S, Porter C. Contribución al conocimiento de *Anopheles (Kerteszia)* Grupo Boliviensis (Diptera: Culicidae) en Colombia: Taxonomía y variabilidad genética. Entomotropica, 2013; 28(2):160.
 50. Rosero-García D, Suaza-Vasco J, Uribe-Soto S. Mosquitos (Diptera: Culicidae) del Páramo de Santa Inés en Belmira, Antioquia: actualización de registros y fortalecimiento de colecciones entomológicas de ecosistemas de alta montaña del MEFLG. Boletín del Mus Entomológico Fr Luis Gall, 2016; 8(2):6-20.
 51. Osorno-Mesa E. Una nueva especie de *Anopheles* de Bogotá, Colombia. Caldasia, 1947; IV(20):431-46.
 52. Rubio-Palis Y. Is *Anopheles argyritarsis* a vector of malaria in the Neotropical Region? J Am Mosq Control Assoc. 1993; 9(4):470-471.
 53. Faran M, Linthicum L. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae). Mosq Syst, 1981; 13:1-81.
 54. Arnell JH. Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. Contrib Am Entomol Inst 1973;10(2):1-176.
 55. Chadee D, Tikasingh E, Ganesh R. Seasonality, biting cycle and parity of the yellow fever vector mosquito *Haemagogus janthinomys* in Trinidad. Med Vet Entomol 1992; 6:143-8.
 56. Maestre-Serrano R, Cochero S, Bello B, Ferro C. Actualización de la distribución de especies del género *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) en la Región Caribe colombiana. Biomédica (Bogotá) 2013; 33(1):185-189.
 57. Kumm H, Osorno-Mesa E, Boshell-Manrique J. Studies of mosquitoes of the genus *Haemagogus* in Colombia (Diptera: Culicidae). Biomédica (Bogotá), 1996; 16(4):269-92.
 58. Morales A. Distribución geográfica, horizontal y vertical de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) de Colombia. Rev la Real Acad Ciencias Exactas, Físicas y Nat. 1968; 13:267-72.
 59. Osorno-Mesa E. Two new species of *Haemagogus* from Colombia, *H. andinus* and *H. boshelli* (Diptera: Culicidae). Entomol Soc Washingt, 1944; 46:165-75.
 60. Ospina-Bautista F, Estévez-Varón JV, Betancur J, Realpe-Rebolledo E. Estructura y composición de la comunidad de macro invertebrados acuáticos asociados a *Tillandsia turneri* Baker (Bromeliaceae) en un bosque Alto Andino Colombiano. Acta Zoológica Mex, 2004; 20(1):153-66.
 61. Ospina-Bautista F, Estévez-Varón JV, Realpe E, Gast F. Diversidad de invertebrados acuáticos asociados a Bromeliaceae en un bosque de montaña. Rev Colomb Entomol, 2008; 34(2):224-9.
 62. Galindo P, Shrihongse S, De Rodaniche E, Graysont M. An ecological survey for arboviruses in Almirante,

- Panama, 1959-1962*. *Am J Trop Med Hyg.* 1966; 15(3):385-400.
63. Eldridge B. Evolutionary relationships among California serogroup viruses (Bunyaviridae) and *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1990; 27(5):738-49.
 64. Petersen V, Devicari M, Suesdek L. High morphological and genetic variabilities of *Ochlerotatus scapularis*, a potential vector of filarias and arboviruses. *Parasit Vectors.* 2015; 8(1):128.
 65. Lequime S, Paul R, Lambrechts L. Determinants of arbovirus vertical transmission in mosquitoes. *PLoS Pathog.* 2016; 12(5).
 66. Belkin J, Heinemann S, Page W. The Culicidae of Jamaica The Culicidae of Jamaica (Insecta, Diptera): [(Mosquito studies, XXI)] (Bulletin of the Institute of Jamaica. Science series), 1970, 458.
 67. Rueda L. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. *Zootaxa.* 2004; 589:1-60.
 68. Anduze P. *Aedes (Ochlerotatus) euiris* Dyar. *Boletín Entomol Venez.* 1944; 3(3):161-3.
 69. Sutil O. Enumeracion historica y geografica de las especies de Culicidae de Venezuela ordenadas segun su taxonomia. *Boletín la Dir Malariol y Saneam Ambient.* 1980; 20:1-32.
 70. Rozo-Lopez P, Mengual X. Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *Zookeys.* 2015; 513:39-64.
 71. Levi-Castillo R. Nota sobre la especie *Aedes* [sic] (*Ochlerotatus*) [sic] *milleri* [sic] Dyar, 1922, encontrada en Cuenca (Azuay) Ecuador con la redescription completa de la especie (Diptera-Culicidae). *Transactions 9th International Congress of Entomology Amsterdam.* 1952; 1:182-1.
 72. Harbach R. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa.* 2007; 1668:591-638.
 73. Harbach R. Culicidae classification. Mosquito taxonomic inventory. <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045>. 11 March, 2017.
 74. Olano V, Matiz M, Lenhart A, Cabezas L, Vargas S, Jaramillo J *et al.* Schools as potential risk sites for vector-borne disease transmission: mosquito vectors in rural schools in two municipalities in Colombia. *J Am Mosq Control Assoc.* 2015; 31(3):212-222.
 75. Lozano-Fuentes S, Hayden MH, Welsh-Rodriguez C, Ochoa-Martinez C, Tapia-Santos B, Kobylinski KC *et al.* The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87(5):902-9.
 76. INBio. Biodiversidad de Costa Rica. *Aedes aegypti*. <http://atta2.inbio.ac.cr/neoportal-web/species/Aedes%20aegypti>. 13 April, 2016.
 77. Suárez M, Nelson M. Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica (Bogotá).* 1981; 1(4):225.
 78. Berlin O, Belkin J. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). XXXVI. Subgenera *Aedinus*, *Tinolestes*, and *Anodioparpa* of *Culex*. *Contrib Am Entomol Inst* 1980; 17(2):1-104.
 79. Navarro J, Bastidas R, Zavala Y. Fauna de mosquitos (Diptera: Culicidae) del Estado Falcon, Venezuela. I. Nuevos registros y listado general de especies. *Zool Acta Científica Venez.* 1994; 45(4):315-24.
 80. Barreto-Reyes P, Lee V. Artropodos hematofagos del rio raposo, Valle, Colombia. *Caldasia.* 1969; X(49):407-40.
 81. Navarro J, Arrivillaga J, Morales D, Ponce P, Cevallos V. Evaluación rápida de biodiversidad de mosquitos (Diptera: Culicidae) y riesgo en salud ambiental en un área Montana del Chocó Ecuatoriano. *Entomotropica.* 2015; 30(16):160-73.
 82. Vasconcelos PF, Da Rosa JF, Da Rosa AP, Degallier N, Pinheiro Fde P, Sa Filho GC. [Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991; 33(6):465-76.
 83. Alto B, Connelly C, O'Meara G, Hickman D, Karr N. Reproductive biology and susceptibility of Florida *Culex coronator* to infection with West Nile Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14(8):606-14.
 84. Duret J. *Culex (Culex) chitae* una nueva especie de Colombia. *Neotropica.* 1967; 13(42):113-6.
 85. Rojas-Mogollón M, Hernández-Neuta G, Moncada-Alvarez L, Quiñones M, Rentería-Ledezma L. Actividad de picadura de *Culex quinquefasciatus* (Say, 1863) [sic] en Bogotá, Colombia. *Rev la Fac Med.* 2013; 61(3):261-6.
 86. Salazar MJ, Moncada LI. Ciclo de vida de *Culex quinquefasciatus* Say, 1826 (Diptera: Culicidae) bajo condiciones no controladas en Bogotá. *Biomedica.* 2004; 24(4):385-92.
 87. Segura NA, Santamaria E, Cabrera OL, Bello F. Establishment and characterisation of a new cell line derived from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(1):89-95.
 88. Rivera-Pineda M, Garzon-Lozano S, Villareal-Salaza L. El mosquito *Culex quinquefasciatus*, una plaga urbana. *Rev Clepsidra.* 2008; 4(7):73-8.
 89. Oda T, Uchida K, Mori a, Mine M, Eshita Y, Kurokawa K *et al.* Effects of high temperature on the emergence and survival of adult *Culex pipiens molestus* and *Culex quinquefasciatus* in Japan. *J Am Mosq Control Assoc.* 1999; 15(2):153-6.
 90. Harbach R. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): the foundation for molecular systematics and phylogenetic research. *Acta Trop.* 2011; 120:1-14.
 91. Lane J, Whitman L. The subgenus "*Microculex*" in Brazil (Diptera, Culicidae). *Rev Bras Biol.* 1951; 11:341-366.
 92. Ceretti-Junior W, Christie R, Rizzo M, Strobel R, Junior M, Mello M *et al.* Species composition and ecological aspects of immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in bromeliads in urban parks in the city of São Paulo, Brazil. *J Arthropod Borne Dis.* 2016; 10(1):102-12.
 93. Stein M, Ludueña-Almeida F, Willener J, Almirón W. Classification of immature mosquito species according to characteristics of the larval habitat in the subtropical province of Chaco, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(4):400-7.
 94. Rosero-García D, Bickersmith S, Suaza-Vasco J, Porter C, Correa M, Conn J *et al.* Molecular operational taxonomic units of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in high Andean mountain ecosystems of

- Antioquia, Colombia. Zootaxa, 2017; 4277(3):369-85.
95. Barajas J, Suaza JD, Torres C, Rúa-Uribe G, Uribe S, Porter CH. Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia. Rev Colomb Entomol. 2013; 39(1):132-40.
 96. Navarro J, Enríquez S, Duque P, Campaña Y, Benítez-Ortíz W. New mosquito species records for Ecuador, from Pulumahua volcano (Andes) and Napo province (Amazon). J Entomol Zool Stud. 2015; 3(6):392-6.
 97. Duret J. *Uranotaenia riverai* una nueva especie de Colombia (Diptera, Culicidae) [sic]. Rev la Soc Entomológica Argentina, 1970; 32(1-4):43-6.
 98. Rozo-Lopez P, Mengual X. Updated list of the mosquitoes of Colombia (Diptera: Culicidae). Biodivers Data J, 2015; 3:e4567.
 99. Dantur-Juri M, Claps G, Santana M, Zaidenberg M, Almiron W. Abundance patterns of *Anopheles pseudopunctipennis* and *Anopheles argyritarsis* in northwestern Argentina. Acta Trop, 2010; 115(3):234-41.
 100. Galante G, Santana M, Veggiani-Aybar C, Dantur-Juri M. Survival of the immature stages of the malaria vectors *Anopheles pseudopunctipennis* and *Anopheles argyritarsis* (Diptera: Culicidae) in Northwestern Argentina. Florida Entomol. 2014; 97(1):191-202.
 101. Manguin S, Roberts DR, Andre RG, Rejmankova E, Hakre S. Characterization of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) larval habitats in Belize, Central America. J Med Entomol. 1996; 33(2):205-11.
 102. Mühlens P, Dios R, Petrocchi J, Zuccarini J. Paludismo en el Norte Argentino. Rev del Inst Bacteriológico del Dep Nac Hig. 1925; 4:207-89.
 103. Gutiérrez LA, González JJ, Gómez GF, Castro MI, Rosero DA, Luckhart S *et al.* Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009; 104(8):1117-24.
 104. Frederickson E. Bionomics and control of *Anopheles albimanus*. Washington, D. C.: Pan American Health Organization. (Technical Paper No. 34), 1993, 76.
 105. Pinault L, Hunter F. New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. Malar J. 2011; 10:236.
 106. Fuller D, Ahumada M, Quiñones M, Herrera S, Beier J. Near-present and future distribution of *Anopheles albimanus* in Mesoamerica and the Caribbean Basin modeled with climate and topographic data. Int J Health Geogr, 2012; 11:13.
 107. Eisen L, Moore CG. *Aedes (Stegomyia) aegypti* in the Continental United States: a vector at the cool margin of its geographic range. J Med Entomol. 2013; 50(3):467-78.
 108. Berrocal L, Peña J, González M, Mattar S. Virus del oeste del Nilo: ecología y epidemiología de un patógeno emergente en Colombia. Rev Salud Pública, 2006; 8(2):218-28.
 109. Mattar S, Edwards E, Laguado J, Gonzalez M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus antibodies in Colombian horses. Emerg Infect Dis J. 2005; 11(9):1497-8.



<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4277.3.3>

<http://zoobank.org/urn:lsid:zoobank.org:pub:02CEA6C5-5F12-4D34-A8BC-2EB87E4CD1C7>

Molecular operational taxonomic units of mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in high Andean mountain ecosystems of Antioquia, Colombia

DORIS ROSERO-GARCÍA^{1,5}, SARA A. BICKERSMITH², JUAN DAVID SUAZA-VASCO¹, CHARLES PORTER¹, MARGARITA M. CORREA³, JAN E. CONN^{2,4} & SANDRA URIBE-SOTO¹

¹Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Calle 59A 63-20. Bloque 16, Laboratorio 102. Medellín, Colombia

²Griffin Laboratory, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Slingerlands, New York, United States of America

³Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Calle 67 No. 53-108, off. 5-430, Medellín, Colombia

⁴Department of Biomedical Sciences, School of Public Health, State University of New York, Albany, New York, United States of America

⁵Corresponding author. E-mail: doris.rosero@udea.edu.co

Abstract

Accurate taxonomic identification of highland mosquito species may be complicated because of the lack of comprehensive regional morphological keys and taxonomic specialists, particularly for mosquitoes of medical or ecological importance. We applied a multi-locus approach to explore the diversity of genera/species collected, to define the Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) and to perform phylogenetic clustering. Twenty MOTUs and three single sequences were revealed from 78 concatenated *cox1* + ITS2 sequences, and the species name was allocated for five of these. This study provides molecular taxonomic information of culicid fauna present in high Andean mountain ecosystems in Antioquia, Colombia. However, future morphological and integrative taxonomic studies should be conducted to achieve the specific identity of all detected MOTUs.

Key words: molecular operational taxonomic units, mosquitoes, *cox1*, highlands, ITS2, Colombia

Introduction

There are 3,554 mosquito species recorded worldwide (Harbach, 2017) of which 353 are estimated to be present in Colombia (WRBU, 2017). In this country, mosquito studies have focused mainly on the malaria vector species in lowland areas (Gutiérrez *et al.*, 2009; Naranjo-Díaz *et al.*, 2014; Ahumada *et al.*, 2016), dengue (Santacoloma-Varón *et al.*, 2010; Quintero *et al.*, 2014; Castrillón *et al.*, 2015) and arbovirus vectors (Barajas *et al.*, 2013; Hoyos-López *et al.*, 2015; Suaza-Vasco *et al.*, 2015). Regarding mosquito species in highland ecosystems, there are few records in Colombia and most pertain to the tribe Aedini. Recently, *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) was recorded at an elevation of 2,252 m and was found infected with dengue virus in Bello, Antioquia Department at 1,980 m (Ruiz-López *et al.*, 2016). In addition, *Anopheles* (*Anopheles*) *pseudopunctipennis* (Theobald), a secondary vector of malaria in Colombia, has been recorded at 2,005 m and 2,153 m in the Caldas Department (Galvis, 1943). There are also records of mosquitoes of medical or ecological importance in high Andean mountain ecosystems in other South American countries, e.g. Bolivia (Rutar *et al.*, 2004), Ecuador (Pinault & Hunter, 2011) and Venezuela (Navarro *et al.*, 2010).

Characterizing the mosquito fauna present in ecosystems above 2,000 m is important because it may provide baseline data for future comparisons and contribute to insect inventories (Barratt *et al.*, 2003; Monaghan *et al.*, 2005). In addition, these species may reflect differences in gradient distribution patterns related to environmental changes and/or anthropic activities (Pemola Devi & Jauhari, 2004). For example, global warming may cause the movement of some species to higher elevations where temperatures have or may become suitable for survival,

whereas other species may respond differently to these changes by becoming locally extinct because of their inability to adapt to new, perhaps more extreme, conditions (Feo *et al.*, 2009; Githeko *et al.*, 2009). However, evaluating the mosquito diversity above 2,000 m can be challenging, because of the limited knowledge of the species, lack of taxonomic specialists and presence of cryptic or species complexes in which morphological characters alone cannot distinguish species (Hajibabaei *et al.*, 2006; Bickford *et al.*, 2007; Wolff *et al.*, 2016). Finally, taxonomic keys may not be available, making it difficult to determine whether the specimen under study belongs to a previously described species or a new one.

In the latter context, multiple approaches to provide taxonomic information are desirable (Rubinoff, 2006; Krishna-Krishnamurthy & Francis, 2012). The 5' end of the cytochrome c oxidase subunit 1 gene (*cox1*) is frequently sequenced to confirm or to complement the identity of mosquito species from South American countries (González *et al.*, 2010; Arregui *et al.*, 2015; López-Rubio *et al.*, 2016). One interesting use of *cox1* barcode sequences is the definition of Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) in which a cluster of sequences that differ from each other are proposed as taxonomic units of differentiation (Floyd *et al.*, 2002; Blaxter, 2004). In Colombia, for the Albitarsis Group of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*), two differentially distributed MOTUs were detected, *An. albitarsis* I in the northwest and northeast and *An. albitarsis* E and F in the northeast (Gómez *et al.*, 2013). In addition, seven MOTUs were identified using *cox1* + ITS2 markers in *Anopheles* species of the Neotropical Arribalzagia Series (subgenus *Anopheles*) (Gómez *et al.*, 2015). It is well known that the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of ribosomal DNA is informative for molecular differentiation of species belonging the genera *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta* and *Ochlerotatus*, among others (Wesson *et al.*, 1992; Bargues *et al.*, 2006; Cienfuegos *et al.*, 2011; Khoshdel-Nezamiha *et al.*, 2016).

Considering that the reliance on a single genetic marker may give misleading results (Dupuis *et al.*, 2012), in the present study we evaluated a multi-locus (*cox1* + ITS2) approach for its effectiveness in the identification of MOTUs in mosquitoes collected in high Andean mountain ecosystems. We hypothesized that the combined sequences would identify Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) more accurately than a single locus analysis within each genus of mosquitoes present above 2,000 m in Antioquia, Colombia.

Material and methods

Mosquito sampling and morphological identification of genera and sub genera. Mosquitoes were collected from six sites within three localities in Antioquia Department. The municipality of Belmira (BEL) (06° 36' 18" N, 75° 39' 57" W), Jardín (JAR) (05° 35' 03" N, 75° 46' 02" W) and Jericó (JER) (05° 47' 18" N, 75° 47' 26" W). The altitudinal range was between 2,009–3,098 m and a minimum of two field collections were performed each year in each locality (Fig. 1). Adult mosquitoes were collected using entomological nets, mouth aspirators and Shannon traps, and larvae and pupae were sampled with pipettes and transported to the laboratory and reared to obtain adults (Belkin *et al.*, 1969; Louton *et al.*, 1996). Representative larval exuviae and male genitalia were mounted on microscope slides in Euparal (Pecor & Gaffigan, 1997), and at least five voucher specimens selected based on apparent morphospecies were deposited in the collection of the Entomological Museum Francisco Luis Gallego, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Mosquitoes were identified using morphological keys and reviews available for Neotropical Culicidae (Lane, 1953; Mattingly, 1971; Forattini, 2002) and for the genera and subgenera of *Anopheles* (González & Carrejo, 2009; Harrison *et al.*, 2012), *Culex* (Bram, 1967), *Haemagogus* (Levi-Castillo, 1954; Arnell, 1973), *Aedes* (*Howardina*) (Berlin, 1969), *Aedes* (*Ochlerotatus*) (Arnell, 1976), *Trichoprosopon* (Stone, 1944; Zavortink, 1979) and *Wyeomyia* (Judd, 1998; Motta & Lourenço-de-Oliveira, 2000). The generic and subgeneric names of aedine mosquitoes follow the more recent classification proposed by Wilkerson *et al.* (2015), available at Systematic Catalog of Culicidae, Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU, 2017).

DNA isolation, PCR amplification and sequencing. Genomic DNA was extracted from one or two legs of each adult mosquito and from the abdominal segments III–V of each larva. The extraction was carried using a QIAcube instrument and the DNeasy Blood & Tissue Handbook protocol (Qiagen, CA, USA) following the manufacturers' instructions. An approximate 700 bp fragment of the *cox1* gene was amplified using universal primers LCO 1490F and HCO 2198R (Folmer *et al.*, 1994) and modified PCR conditions (Batovska *et al.*, 2016). A rDNA ITS2 region of approximately 500 bp was amplified for selected specimens of each *cox1* haplotype using 5.8S F and 28S primers (Collins & Paskewitz, 1996) following the protocol below. The total PCR volume was 25

μL and consisted of 1X buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 1.25 mM dNTPs, 0.4 mM of each 10 μM primer, 0.08 U Taq DNA Polymerase and 4 μL template DNA. The final volume was adjusted with 12.6 μL of ddH_2O . Cycling conditions were 94°C for 3 min, 36 cycles of 94°C for 1 min, 46°C for 1 min and 72°C for 1.5 min, and a final extension at 72°C for 15 min. Each PCR reaction was carried out using the Qiagen Taq DNA polymerase kit (Qiagen, CA, USA) and performed on a Bio-RAD C1000 touch™ thermal cycler (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). PCR products were visualized in 1.0% agarose gels stained with GelRed™ nucleic acid gel stain (Phenix Research Products, NC, USA). PCR products were purified with ExoSAP-IT (USB Corporation, Ohio, USA) and Sanger sequencing was performed at the Applied Genomic Technologies Core (Wadsworth Center, New York State Department of Health, NY, USA) on an ABI PRISM 3700 genetic analyzer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Sequence editing and analysis. All sequences were edited using Geneious Pro 9.1.4 (Kearse *et al.*, 2012). For *cox1* sequences, a scheme to rule out co-amplifications of nuclear mitochondrial DNA (NUMTs) was implemented (Song *et al.*, 2008; Buhay, 2009; Hlaing *et al.*, 2009). ITS2 sequences were checked for insertions and deletions. Each individual sequence of ITS2 was annotated following parameters available in the ITS2 database (Keller *et al.*, 2009). All consensus sequences were aligned with the Muscle algorithm (Edgar, 2004) plugin in Geneious (Biomatters). The identity of each individual *cox1* or ITS2 sequence was estimated using MegaBLAST (Ashfaq *et al.*, 2014). In cases where the match was 98% sequence similarity, the species name for the individual sequence was allocated (Ratnasingham & Hebert, 2007). The *cox1* and ITS2 sequences obtained were submitted to GenBank (KY117238–KY117452).

The number of haplotypes was estimated for each *cox1* and ITS2 dataset separately using DnaSP v. 5.0 (Rozas *et al.*, 2003). Neighbour Joining (NJ) and Bayesian Inference (BI) analyses were performed for the *cox1*, ITS2 and *cox1* + ITS2 datasets. The best-fit model of DNA substitution was determined by jModeltest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012). The NJ analyses were performed using the Kimura-2-parameter (K2P) recommended for species-level in barcoding analysis (Hebert *et al.*, 2003) with 10,000 bootstrap replicates. The BI analysis was implemented in MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), and the Markov Chain Monte Carlo algorithm was allowed to run four chains for at least 5,000,000 generations, sampling every 1,000 generations, with a burn-in of 25%. *Chironomus kiiensis* (Diptera: Chironomidae) and *Nephrotoma altissima* (Diptera: Tipulidae) were used as “nearest neighbour” taxa and “outgroup”, respectively, to root the trees (GenBank accessions KJ424336 and KR439445), which were selected according to molecular phylogenetic analysis (Friedrich & Tautz, 1997). Genetic distances were calculated using the K2P model in MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2011).

MOTU determination. Three similarity-based analyses for generating molecular clusters (MOTUs) were compared: Barcode Index Number (BIN) (Ratnasingham & Hebert, 2013), Automated Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012) and the Java program jMOTU (Jones *et al.*, 2011). The Refined Single Linkage (RESL) algorithm adopted in the Barcode of Life Database (BOLD) provided Barcode Index Number (BIN) assignments for each *cox1* sequence (Ratnasingham & Hebert, 2013). This analysis using standard BIN assignments is available at BOLD v3.6 (<http://www.boldsystems.org>). The ABGD method was implemented through the ABGD source available on the web interface (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>) to obtain the partitioning of the *cox1* sequence datasets into clusters (Puillandre *et al.*, 2012). In the jMOTU program a 2.5% cut-off was used and a Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) identity filter of 95 was employed. Clusters were arranged using the number of variable nucleotides, equivalent to *p*-distance (Jones *et al.*, 2011).

To test whether the MOTUs derived from all analyses represent putative species, the species delimitation plugin for Geneious (Masters *et al.*, 2011) was used to calculate *Rosenberg's* P_{AB} value, which tests for taxonomic distinctiveness based on the null hypothesis that the observed monophyly was found by chance alone. *Rosenberg's* P_{AB} calculates the probability that a MOTU with “A” haplotype is monophyletic to its closest relative with “B” haplotype (Rosenberg, 2007). In addition, sequences from GenBank corresponding to species of a genus previously reported at high altitude in Latin American countries, or in this study based on the morphological assignment, were used to establish the hypothetical position of each MOTU (Ng'endo *et al.*, 2013). Finally, a MOTU was considered valid within a genus if the following requirements were met: (i) concordance among monophyletic groups found in ABGD, jMOTU, NJ and BI; (ii) >2% K2P distance among MOTUs; and (iii) significant ($p < 0.05$) *Rosenberg's* P_{AB} values. Concordance of the results of the molecular analysis was evaluated in a matrix constructed in Microsoft® Excel 2013 version. For *cox1* sequences with a match success in BOLD or GenBank above 98%, the species name was allocated.

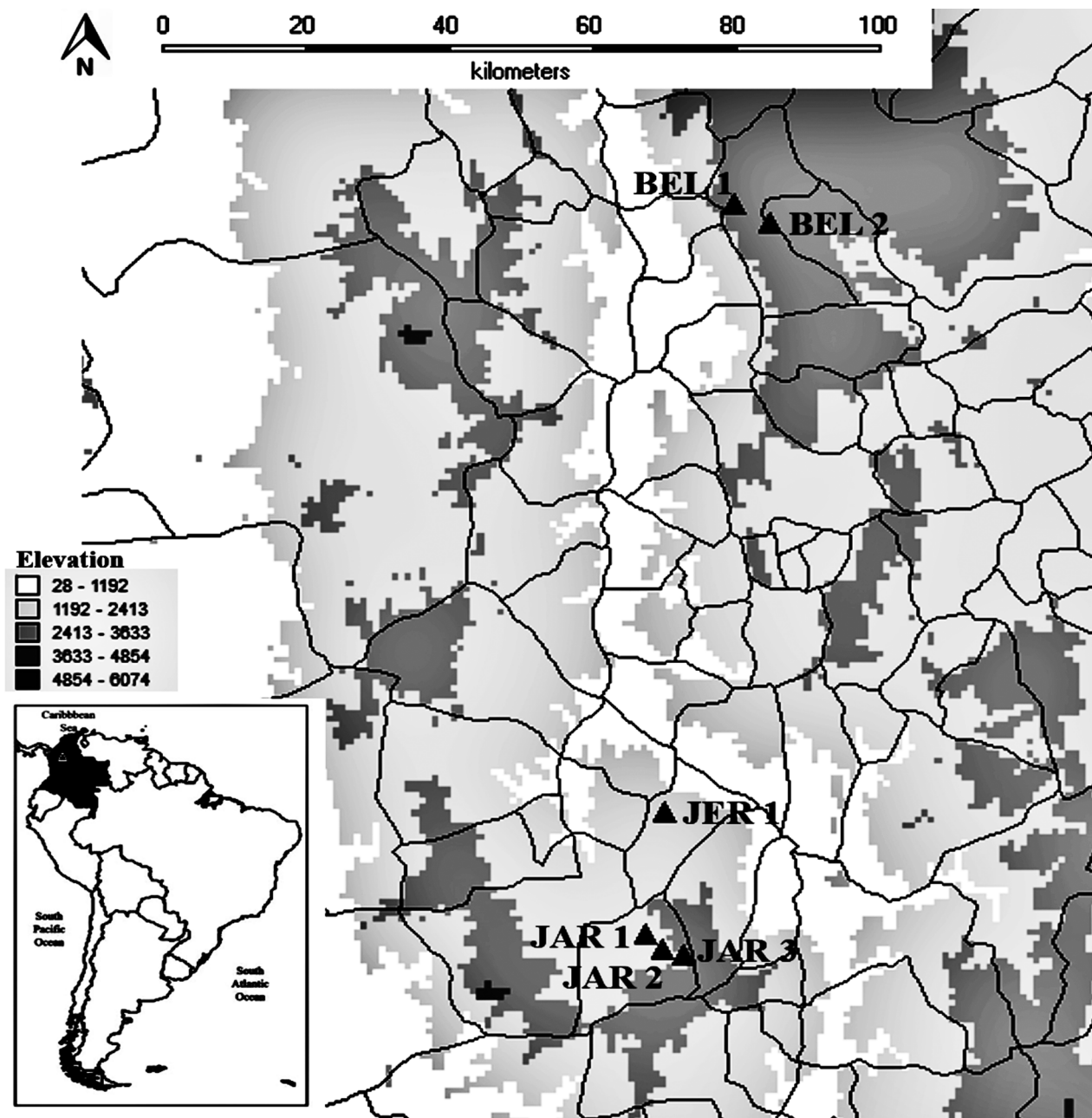


FIGURE 1. Localities (BEL = Belmira, JAR = Jardín, JER = Jericó) for mosquitoes collected above 2,000 m.

Results

Morphological identification of genera and subgenera. Four genera and two subgenera were identified in the altitudinal range of 2,009–3,098 m using morphology-based keys (Table 1): *Anopheles* ($n = 10$), *Culex* ($n = 25$), *Aedes* (*Howardina*) ($n = 62$), *Aedes* (*Ochlerotatus*) ($n = 19$), *Trichoprosopon* ($n = 6$) and *Wyeomyia* ($n = 8$). Seven specimens damaged during field sampling were morphologically assigned as *Howardina/Ochlerotatus* ($n = 6$) and *Trichoprosopon?* ($n = 1$). These specimens were also processed to evaluate the correlation between morphological identification and their identity based on their MOTU grouping or by comparison with available sequences.

Sequence analyses. After sequence editing, a 640 bp 5' *cox1* barcode fragment was obtained for 137 specimens and 117 haplotypes were generated. No indels or stop codons were observed in the barcode sequences, ensuring that they did not constitute NUMTs. ITS2 sequences were obtained for 78 representative specimens from each group defined by the *cox1* NJ dendrogram (Table 2). The ITS2 analysis revealed substantial length variation

in ITS2 among representatives of the six groups: *Anopheles* 527 bp, *Culex* 523 bp, *Ae. (Howardina)* 379 bp, *Ae. (Ochlerotatus)* 422 bp, *Trichoprosopon* 359 bp and *Wyeomyia* 409 bp. Comparison of the sequences with those in GenBank revealed close matches (>98% nucleotide identity) for only three of the 137 *cox1* sequences: two *cox1* sequences of larvae collected from the leaf based of a species of *Xanthosoma* at 2,009 m in Jericó were 98% similar to *Trichoprosopon evansae* (Antunes) (GenBank accession KM593039) collected in Rio Sucio, Caldas, Colombia at 1,960 m (Rozo-Lopez & Mengual, 2015). The other *cox1* sequence corresponding to an adult female reared in the laboratory from a larva collected from a bromeliad at 2,862 m in Belmira was 99% similar to *Culex (Microculex) imitator* (Theobald) (GenBank accession GU291979) from Espirito Santo, Santa Teresa, Brazil (Demari-Silva *et al.*, 2011). The ITS2 results did not reveal any close GenBank sequence matches.

TABLE 1. Generic identification based on morphology and number of specimens (sequences) of each genus.

Genus (subgenus)	<i>cox1</i>	ITS2	Locality	Geographic coordinates"	Altitude (m)
<i>Anopheles</i>	7F, 1F*, 1L	7F, 1F*, 1L	Jardín	05° 36' 49" N, 75° 48' 57" W	2,100–2,403
<i>Anopheles</i>	1F	1F	Belmira	06° 38' 45" N, 75° 42' 14" W	2,977
<i>Culex</i>	23L, 1F*	1L, 1F*	Jardín	05° 36' 49" N, 75° 48' 57" W	2,481
<i>Culex</i>	1F*	1F*	Belmira	06° 37' 08" N, 75° 39' 25" W	2,862
<i>Aedes (Howardina)</i>	17F, 7F*, 7M*	5F, 6F*, 4M*	Jardín	05° 35' 53" N, 75° 47' 37" W	2,100–2,521
<i>Aedes (Howardina)</i>	18F, 5L, 5F*, 3M*	15F, 1L, 4F*, 1M*	Belmira	06° 38' 50" N, 75° 42' 35" W	2,734–3,098
<i>Aedes (Ochlerotatus)</i>	2F, 1L, 10F*, 5M*	1F, 7F*, 4M*	Jardín	05° 35' 02" N, 75° 46' 04" W	2,100
<i>Aedes (Ochlerotatus)</i>	1F	1F	Belmira	06° 38' 45" N, 75° 42' 14" W	2,928
<i>Aedes (How./Och.)</i>	2F	2F	Jardín	05° 36' 49" N, 75° 48' 57" W	2,100–2,928
<i>Aedes (How./Och.)</i>	4F	4F	Belmira	06° 38' 45" N, 75° 42' 14" W	2,928
<i>Trichoprosopon</i>	1F, 1F*, 1M*	0	Jardín	05° 36' 50" N, 75° 48' 59" W	2,025–2,253
<i>Trichoprosopon?</i>	1F	1F	Jardín	05° 36' 50" N, 75° 48' 59" W	2,253
<i>Trichoprosopon</i>	3L	3L	Jericó	05° 47' 18" N, 75° 47' 26" W	2,009
<i>Wyeomyia</i>	6F	5F	Jardín	05° 36' 50" N, 75° 48' 59" W	2,253–2,403
<i>Wyeomyia</i>	1F	1F	Belmira	06° 38' 45" N, 75° 42' 14" W	2,977
<i>Wyeomyia</i>	1L	0	Jericó	05° 47' 18" N, 75° 47' 26" W	2,044

F: female, M: male, L: larvae, *reared in the laboratory.

MOTU determination based on DNA barcodes. Barcode Index Number (BIN). The online classification of each sequence individually was treated as “unknown specimen” in the BOLD database (Fig. 2). Remarkably, 132 *cox1* sequences did not match any records in BOLD, and BINs were assigned only for five *cox1* sequences (Table 2). One *cox1* sequence of an adult female from Jardín collected at 2,403 m (Shannon trap) and one larvae collected from a bromeliad at 3,000 m in Belmira were 97.3% similar to *Ae. (Ochlerotatus) euiris* (Dyar), previously recorded in Colombia by Rozo-Lopez & Mengual (2015). However, the *Ae. euiris* sequences grouped with *Aedes (Howardina) quadrivittatus* (Coquillett) from Hidalgo, Mexico and *Aedes (Howardina) sexlineatus* (Theobald) from Magdalena, Colombia (Fig. 2A). A detailed morphological review of our specimens resulted in verification of members of the subgenus *Howardina*. Three *cox1* sequences of *Anopheles* females collected at 2,403 m (Shannon trap) in Jardín municipality were 98.1% similar to *Anopheles* MBI-06 (Fig. 2B) collected in Merida, Venezuela, which were in turn part of a group called “Boliviensis”: *Anopheles boliviensis* (Theobald) and *Anopheles rollai* (Cova García, Pulido F. & Escalante de Ugueto).

Automated Barcode Gap Discovery (ABGD) and jMOTU. The species delimitation analysis based on 117 *cox1* haplotypes using ABGD produced 23 groups with 21 single sequences, and with jMOTU resulted in 11 MOTUs and 102 single sequences (Table 2). The single sequences were not considered to be MOTUs and additional sampling is desirable at the locations in Jardín and Belmira, along with complementary analyses for

MOTU detection. Both ABGD and jMOTU methods were congruent for two MOTUs within each of the genera *Anopheles* and *Culex* and *Ae. (Howardina)*, and for one MOTU within the genus *Trichoprosopon*. For *Ae. (Ochlerotatus)* and the genus *Wyeomyia*, no MOTUs were congruent between ABGD and jMOTU analyses. The results revealed a striking difference in performance between methods for MOTU determination. The difference between groups was only evident for members of the genus *Anopheles* where the ABGD and jMOTU results were congruent (Table 2).

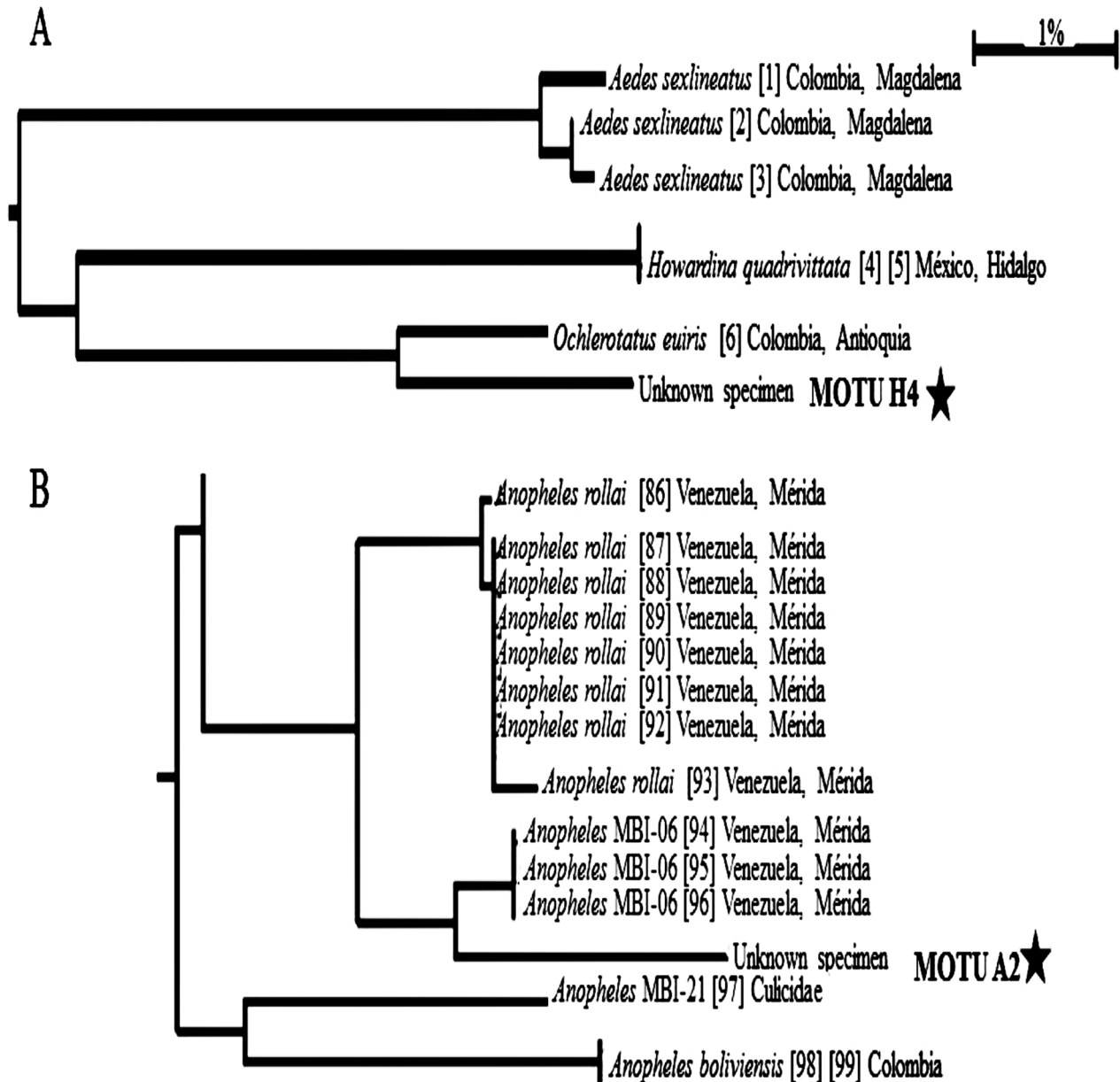


FIGURE 2. Neighbour-Joining taxon identification dendrograms based on *cox1* sequences. Original BOLD dendrogram requested online for classification of an “unknown”. A. Sequences grouped with *Aedes sexlineatus* and *Aedes quadrivittatus*. B. Sequences grouped with *Anopheles* MBI-06 collected in Merida, Venezuela. There are no bootstrap support values shown on NJ tree because it is a BOLD systems tree.

Neighbour Joining (NJ) and Bayesian Inference (BI). NJ analyses detected 117 *cox1* haplotypes, resulting in 25 groups that were supported by bootstrap values ranging from 56–100% (Table 2; Fig. 3). Interestingly, the four genera and two subgenera based on morphological identification were also represented in the molecular analysis as six different groups with moderate to high bootstrap values: *Ae. (Howardina)* (74%), *Ae. (Ochlerotatus)* (98%), *Culex* (83%), *Wyeomyia* (65%), *Trichoprosopon* (99%) and *Anopheles* (100%) (Fig. 3). In the NJ analysis

of ITS2 sequences, the specimens formed 18 groups with bootstrap values between 51–100% (data not shown). The groupings with ITS2 sequences confirmed the four genera and two subgenera previously detected by morphology and *cox1* data. In addition, results of the NJ dendrogram that included 78 concatenated sequences (*cox1* + ITS2), depicted 22 groups (Table 2) supported by bootstrap values between 56–100% (data not shown).

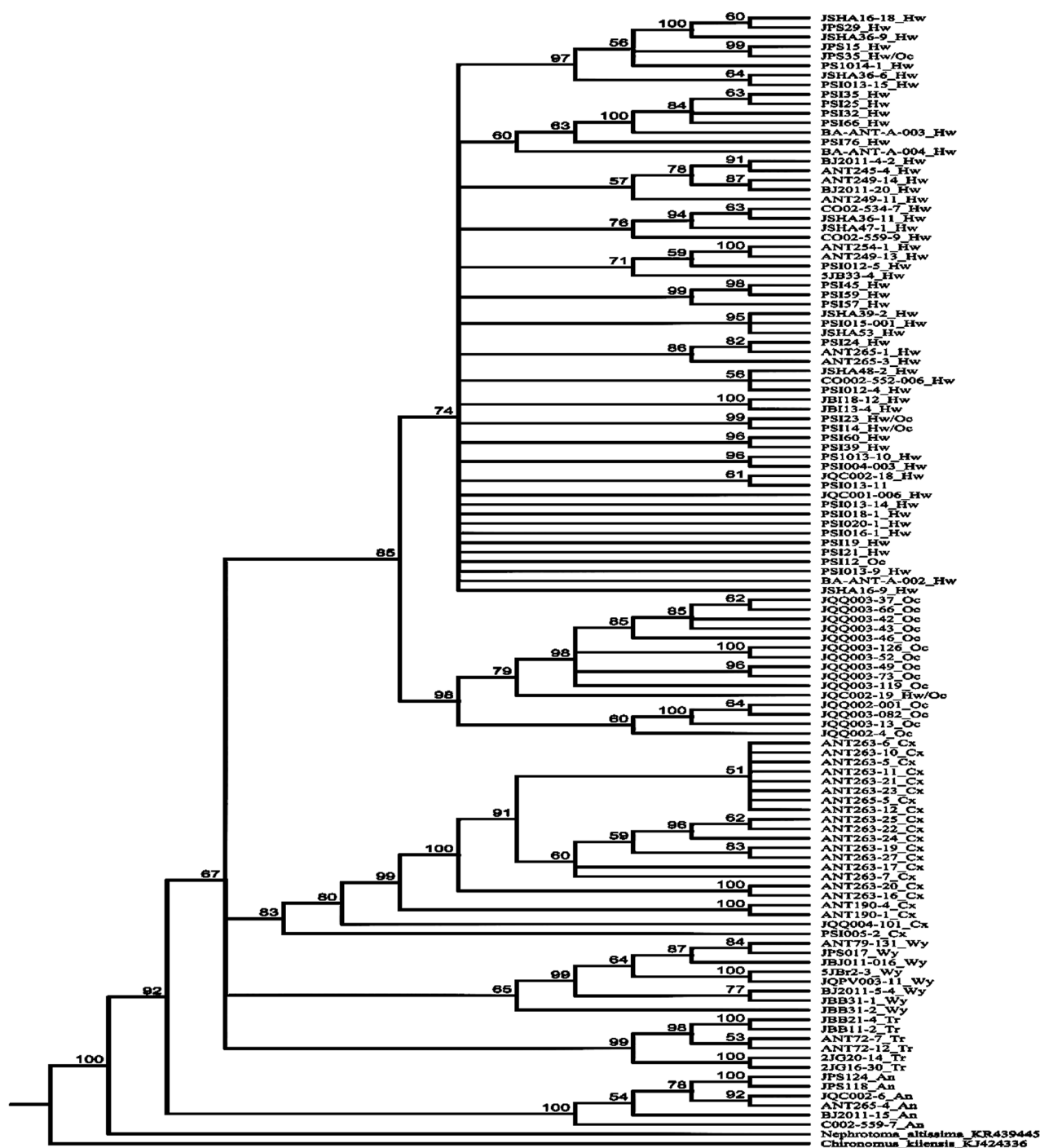


FIGURE 3. Neighbour-Joining topology based on 117 *cox1* haplotypes of the mosquitoes collected above 2,000 m. Numbers on the branches represent bootstrap values (in percentages).

In the BI analysis for each of the *cox1* and ITS2 datasets (data not shown), the sequences of *Ae. (Ochlerotatus)* formed a clearly separate group; however, in the BI analysis of the *cox1* + ITS2 dataset only one group was detected that included both *Ae. (Howardina)* and *Ae. (Ochlerotatus)* (Fig. 4). In the multi-locus analysis (*cox1* + ITS2), 20 monophyletic groups were detected and supported by 0.71–1.00 posterior probability plus five single

sequences (Fig. 4). BI analysis confirmed the groups supported by the NJ analysis within *Anopheles*, *Culex*, *Trichoprosopon* and *Wyeomyia* (Table 2).

TABLE 2. Comparison of Neighbour-Joining (NJ) and Bayesian Inference (BI) methods for MOTU generic clustering of mosquitoes collected above 2,000 m in Antioquia, Colombia.

Genus	Method and region							Mean uncorrected p-distances	
	NJ		<i>cox1</i> + ITS2		Similarity-based analyses			Intraspecific	Interspecific
	<i>cox1</i>	ITS2	NJ	BI	BINs	ABGD	jMOTU		
<i>Anopheles</i>	1	2	2	2	3	2	2	3.0–8.3%	13.7%
<i>Culex</i>	2	1	1	1	--	5	3	9.7%	21.7%
<i>Howardina</i>	14	9	13	10	2	9	4	0.5–8.8%	3.9–11.8%
<i>Ochlerotatus</i>	4	2	3	4	--	4	1	2.1–3.0%	3.8–5.4%
<i>Trichoprosopon</i>	2	1	1	1	--	2	1	3.2%	26.9%
<i>Wyeomyia</i>	2	3	2	2	--	1	0	3.0–3.3%	8.3%
Total	25	18	22	20	5	23	11	-	-

Four specimens of *Howardina/Ochlerotatus* were assigned to *Ae. (Ochlerotatus)*, and one specimen was grouped within *Ae. (Howardina)*. The specimen morphologically identified as *Trichoprosopon?* was molecularly assigned to the genus *Trichoprosopon*, but the closest match to any species in GenBank was 87% or lower.

MOTUs within each genus. Rosenberg's P_{AB} values were significant for all 20 groups ($p < 0.05$). Each of the 20 MOTUs detected was named according to its associated genus and the number of MOTUs within each, as follows: *Anopheles* (A1 and A2), *Culex* (C1), *Ae. (Howardina)* (H1–H9), *Ae. (Ochlerotatus)* (O1–O5), *Trichoprosopon* (T1) and *Wyeomyia* (W1 and W2). Localities, geographic coordinates, altitude, collecting method and collection year for each MOTU are detailed in Table 3. The overall mean nucleotide diversity for the barcode sequences was 0.117. The mean uncorrected p -distances between MOTUs were generally higher than the divergence within the MOTUs, except for subgenus *Howardina*. Within each MOTU, sequence divergences varied from 0.5 (H9) to 9.7% (C1), whereas differences between MOTUs ranged from 3.8 to 26.9% (Table 2).

Taxonomic assignment was performed for four MOTUs (A2, C1, H4 and T1). MOTU A2 was assigned to the “Boliviensis” group based on the BIN results. The only MOTU within *Culex* (C1) consisted of 19 *cox1* sequences from larvae collected in Jardín and one *cox1* sequence of an adult collected in Belmira; all shared the same haplotype and had a 99% nucleotide identity to *Cx. imitator*. For *Ae. (Howardina)*, nine MOTUs were detected among the specimens collected in Jardín and Belmira between 2,100–3,098 m. However, only sequences of MOTU H4 ($n = 4$) were grouped with *Ae. quadrivittatus* according to BIN results. Surprisingly, five MOTUs fell within *Ae. (Ochlerotatus)* (O1–O5), and two of these, O4 and O5, were from the same collection site in Belmira at 2,928 m. It is noteworthy that all haplotypes of the *Trichoprosopon* specimens were grouped together (T1) and were nearest to *Tr. evansae* based on nucleotide identity in MegaBLAST and by NJ grouping. Finally, two MOTUs were detected within the genus *Wyeomyia* from the three municipalities at different altitudes: 2,044 m in Jericó (W2), 2,253–2,403 m in Jardín (W1 and W2) and 2,927 m in Belmira (W1).

Discussion

The present study used a multi-locus approach (*cox1* + ITS2) and morphology to identify mosquitoes collected above 2,000 m in three municipalities of Antioquia Department, Colombia. Briefly, the MOTU approach for identification indicates that two or more sequences that are similar within a defined cut-off threshold are assigned to the same MOTU (Blaxter, 2004). In the present study, the *cox1* and ITS2 analyses were individually unsuccessful at resolving and identifying the 20 MOTUs detected in the concatenated analysis (*cox1* + ITS2) using BI. In agreement with other studies where this analysis provided a more robust estimate of monophyletic groups (Bourke *et al.*, 2013; Conn *et al.*, 2013), the multi-locus (*cox1* + ITS2) approach used here was also a useful tool for MOTU clustering of specimens that were previously identified to genus and subgenus based on morphology.

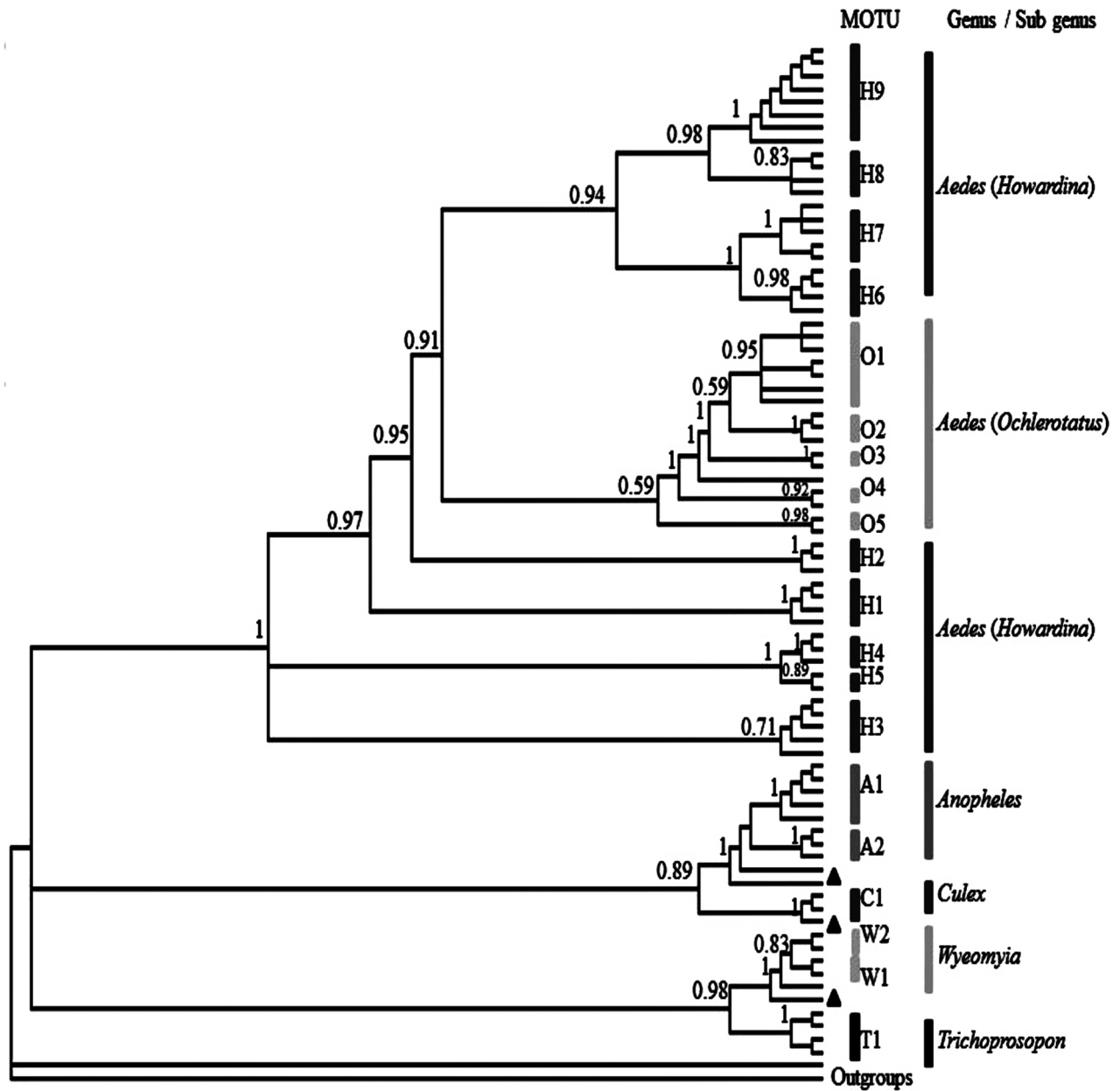


FIGURE 4. Bayesian topology based on multi-locus (*cox1* + ITS2) for mosquitoes collected above 2,000 m. Numbers on the branches represent posterior probabilities and triangles denote the five single sequences.

At least one MOTU within *Anopheles* (A2) is a member of the “Boliviensis” group, which consists of three species with high morphological similarity: *An. boliviensis*, *An. gonzalezrinconesi* (Cova García, Pulido F. & Escalante de Ugueto) and *An. rollai*. These species have been reported in sympatry in high Andean ecosystems associated with arboreal bromeliads at 2,232 m in the Parque Nacional Dinira in Venezuela (Prado, 2003; Navarro *et al.*, 2007, 2010). In Colombia, third- and fourth-instar larvae of the “Boliviensis” group were previously found in arboreal bromeliads at 2,600 m in the Reserva forestal El Romeral (Suaza-Vasco *et al.*, 2013a), and adult females were also collected by Shannon trap in Jardín at 2,400 m (Suaza-Vasco *et al.*, 2013b), both localities in the Antioquia Department. The present study supports previous findings by investigators of the Grupo de Investigación en Sistemática Molecular-GSM in Jardín, Antioquia; complementary morphological and molecular observations are currently being performed (Suaza-Vasco *et al.*, 2013a, 2013b).

TABLE 3. Data for mosquitoes collected above 2,000 m in three localities of Antioquia, Colombia.

MOTU	Localities	Geographic coordinates	Altitude (m)	Habitat (larvae) collection method (adults)	Year	Stage, sex of adults	GenBank accession	
							cox1	ITS2
A1	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	Shannon trap	2014	4F	KY117254-KY117257	KY117380-KY117382, KY117386
A1	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,481	Bromeliad	2012	1L	KY117253	KY117387
A2	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,403	Shannon trap	2014	3F	KY117248-KY117250	KY117378, KY117379, KY117384
C1	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	<i>Xanthosoma</i>	2014	1F*	KY117283	KY117377
C1	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,481	Bromeliad	2012	18L	KY117261-KY117280	KY117376
C1	Belmira 1	06°37'08"N, 75°39'25"W	2,862	Bromeliad	2013	1F*	KY117281	KY117375
H1	Jardín 2	05°35'53"N, 75°47'37"W	2,376	Shannon trap	2012	2F	KY117316, KY117317	KY117426
H1	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	2,905	Aspirator	2013	1F	KY117309	KY117403
H1	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,084	Bromeliad	2013	1F*	KY117313	KY117399
H1	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,098	Aspirator	2013	1F	KY117308	KY117402
H1	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,098	Bromeliad	2013	1F*, 1M*	KY117315, KY117310	KY117400
H2	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,245	Bromeliad	2012	2F*, 1M*	KY117303-KY117305	KY117401, KY117420
H2	Jardín 2	05°35'53"N, 75°47'37"W	2,376	Shannon trap	2012	3F	KY117336, KY117359, KY117323	KY117423, KY117420
H3	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	Shannon trap	2014	1F	KY117306	KY117430
H3	Jardín 2	05°35'53"N, 75°47'37"W	2,376	Shannon trap	2012	5F	KY117353-KY117357	KY117428, KY117421
H3	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,403	Shannon trap	2011	3F	KY117361, KY117362, KY117352	KY117421
H3	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,000	Bromeliad	2013	2L	KY117358, KY117314	KY117437
H4	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	Aspirator	2014	1F	KY117367	KY117424
H4	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,492	Bromeliad	2012	1F*	KY117318	KY117398
H5	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,427	Bromeliad	2009	1M*	KY117365	KY117434
H5	Belmira 1	06°37'08"N, 75°39'25"W	2,734	Bromeliad	2013	1L	KY117366	KY117450
H6	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,481	Bromeliad	2012	1M*	KY117325	KY117431
H6	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,492	Bromeliad	2012	1F*	KY117327	KY117451
H6	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	2,977	Insect net	2011	2F	KY117326, KY117328	KY117452, KY117425
H7	Jardín 2	05°35'53"N, 75°47'37"W	2,376	Shannon trap	2012	2F	KY117320, KY117333	KY117432
H7	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,521	Bromeliad	2013	2F*, 1M*	KY117321, KY117332, KY117319	KY117433

.....continued on the next page

TABLE 3. (Continued)

MOTU	Localities	Geographic coordinates	Altitude (m)	Habitat (larvae) collection method (adults)	Year	Stage, sex of adults	GenBank accession	
							<i>cox1</i>	ITS2
H7	Belmira 1	06°37'08"N, 75°39'25"W	2,734	Bromeliad	2013	2L, 2F*, 2M*	KY117331, KY117329 KY117307, KY117312 KY117324, KY117360 KY117330	KY117449, KY117448
H7	Belmira 1	06°37'08"N, 75°39'25"W	2,862	Bromeliad	2013	2F*		KY117427
H8	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	2,977	Insect net	2011	1F		KY117446
H8	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,000	Aspirator	2013	2F		KY117438
H8	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,098	Aspirator	2013	2F		KY117436
H9	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,481	Bromeliad	2012	2M		KY117429
H9	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	2,905	Aspirator	2013	2F		KY117441, KY117435
H9	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	2,977	Insect net	2011	F		KY117447, KY117442
H9	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,000	Aspirator	2013	3F		KY117419 KY117443
H9	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	3,098	Aspirator	2013	1F		KY117440
O1	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	Aspirator	2014	2F		KY117444
O1	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	Rock hole	2014	1L, 7F*, 2M*		KY117404 KY117410, KY117411 KY117413, KY117414
O2	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	Rock hole	2014	2F*, 1M*		KY117405, KY117406 KY117415
O3	Jardín 3	05°35'02"N, 75°46'04"W	2,100	Rock hole	2014	3M		KY117409, KY117412
O4, O5	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	2,928	Aspirator	2013	5F		KY117416, KY117445, KY117439, KY117422 KY117397
T1	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,253	Insect net	2012	2F		KY117394-KY117396
T1	Jericó 1	05°47'18"N, 75°47'26"W	2,009	<i>Xanthosoma</i>	2011	3L		KY117390, KY117392
W1	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,253	Aspirator	2012	2F		KY117392
W1	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,253	Insect net	2012	1F		KY117372
W1	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,403	Shannon trap	2011	1F		KY117393
W1	Belmira 2	06°38'45"N, 75°42'14"W	2,977	Insect net	2011	1F		KY117391
W2	Jardín 1	05°36'49"N, 75°48'57"W	2,403	Aspirator	2014	1F		KY117388
W2	Jardín 2	05°35'53"N, 75°47'37"W	2,317	Bromeliad	2009	1F		KY117450
W2	Jericó 1	05°47'18"N, 75°47'26"W	2,044	Bromeliad	2011	1L		KY117389

F: female, M: male, L: larvae, *reared in the laboratory.

Only one MOTU was detected among specimens of each of the genera *Culex* and *Trichoprosopon* (C1 and T1 respectively); therefore, it can be inferred that the collections included one species per genus. One *cox1* sequence belonging MOTU C1 was 99% similar to *Cx. imitator* of the subgenus *Microculex*, the species of which have a strong preference for choosing natural containers for oviposition, especially bromeliads (Müller & Marcondes, 2006; Ceretti-Junior *et al.*, 2016). Therefore, we propose that *Culex* MOTU C1 may correspond to *Cx. imitator*, a species whose females apparently do not feed on humans (WRBU, 2017). Immature stages of this species were also collected from axils of bromeliads in association with *Ae. quadrivittatus* in El Cielo Biosphere Reserve above 2,500 m in Tamaulipas State, Mexico (Ortega-Morales *et al.*, 2015). One larva of *Ae. (Howardina)* MOTU H8 and one larva of *Culex* MOTU C1 shared the same bromeliad at 2,862 m in Belmira; consequently, it is suggested that *Ae. quadrivittatus* is present in this municipality in association with *Cx. imitator*.

In the present study, and according to sequence analyses, specimens of *Trichoprosopon* MOTU T1 probably correspond to a lineage or species close to *Tr. evansae*. In Venezuela and Ecuador, immatures of *Tr. evansae* have only been reported inhabiting bamboo internodes and fallen leaves of palm but not in a host plant of Araceae (Navarro *et al.*, 2007). However, a previous study conducted in a coffee-growing region of Colombia reported larvae of *Trichoprosopon* sp. in a *Xanthosoma* leaf axil (Suaza-Vasco *et al.*, 2015). Moreover, at least three species of *Trichoprosopon* are present in the Jardín and Jericó municipalities, including two species of the Pallidiventer Complex, *Tr. evansae* and *Tr. sp. B* (Barajas *et al.*, 2013; Suaza-Vasco *et al.*, 2015). Therefore, we hypothesize that the two *cox1* sequences from *Trichoprosopon* adult females collected in Jardín at 2,253 m are *Tr. evansae*, a species previously reported in this municipality. Three *cox1* sequences from *Trichoprosopon* larvae within MOTU T1 and collected from the axils of a *Xanthosoma* sp. in Jericó at 2,009 m are possibly *Tr. sp. B*. Further studies are necessary to determine the precise species identity of specimens assigned to *Trichoprosopon* MOTU T1.

In general, the tribe Aedini, with 1,261 species, is the largest in the family Culicidae (Harbach, 2017). In Colombia, specimens of this tribe have not been well studied in high altitude zones, thus additional and/or undiscovered species may exist. In the present study, combined analysis of *cox1* + ITS2 failed to show significant groupings of *Ae. (Howardina)* and *Ae. (Ochlerotatus)* MOTUs, five *Ae. (Ochlerotatus)* MOTUs (O1–O5) grouped with four *Ae. (Howardina)* MOTUs (H6–H9) in a strongly supported monophyletic group. In future studies, we suggest the use of sequences of some specimens from lowlands to test the monophyly and status of these subgenera. This, taking into account that the monophyly of groups within the tribe Aedini is only partially supported, making it reasonable, at the moment, to preserve the groups as subgenera or informal groups (Wilkerson *et al.*, 2015). Moreover, we consider that the number of MOTUs that were found for *Ae. (Howardina)* and *Ae. (Ochlerotatus)* is high and additional studies including other taxonomic and ecological characters are necessary to corroborate or modify that number.

In summary, our results provide 20 MOTUs of mosquitoes present in high Andean mountain ecosystems in Antioquia, Colombia. However, these 20 MOTUs may not necessarily correspond to 20 known or described species, but can be treated as such for measuring diversity and testing hypotheses, as has been previously suggested (Ryberg 2015). Further studies are necessary to establish the relationships between MOTUs and putative species, with a deeper analysis including detailed morphological study of newly collected mosquitoes. Finally, the multi-locus approach will be useful for less-experienced researchers in morphological identification who are interested in the MOTU identification of mosquito specimens.

Acknowledgements

This work was supported by the Programa Nacional de Semilleros de Investigación, Creación e Innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2013–2015, grant 25675 to SUS. The National Institutes of Health (NIH) grant R01 AI110112 to JEC and Estrategia para la Sostenibilidad de Grupos de Investigación 2016–2017, UdeA, code No. ES84160123, Universidad de Antioquia. DRG received financial support for her doctoral studies from Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación –COLCIENCIAS, Colombia, Convocatoria 528-2011. We are grateful to Steven Galeano, Diego Puerta, Maria Contreras and other members of the Grupo de Investigación en Sistemática Molecular (GSM) for assistance in the field and laboratory.

Author contributions

DRG, JEC, MMC and SUS participated in study design, data analysis and writing the manuscript. DRG and SB performed laboratory work. DRG, JDS and CP collected mosquitoes. JDS and CP identified specimens based on morphology. All authors critically reviewed the manuscript and approved the final version.

References

- Ahumada, M., Orjuela, L., Pareja, P., Conde, M., Cabarcas, D., Cubillos, E., López, J., Beier, J., Herrera, S. & Quiñones, M. (2016) Spatial distributions of *Anopheles* species in relation to malaria incidence at 70 localities in the highly endemic Northwest and South Pacific coast regions of Colombia. *Malaria Journal*, 15, 407.
<https://doi.org/10.1186/s12936-016-1421-4>
- Arnell, J.H. (1973) Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 10 (2), 1–176.
- Arnell, J.H. (1976) Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXIII. A revision of the scapularis group of *Aedes* (*Ochlerotatus*). *Contributions of the American Entomological Institute*, 13 (3), 1–143.
- Arregui, G., Enriquez, S., Benítez-Ortiz, W. & Navarro, J. (2015) Taxonomía molecular de *Anopheles* del Ecuador mediante ADN mitocondrial (Citocromo c Oxidasa I) y optimización por Parsimonia Máxima. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 55, 132–154.
- Ashfaq, M., Hebert, P.D., Mirza, J.H., Khan, A.M., Zafar, Y. & Mirza, M.S. (2014) Analyzing mosquito (Diptera: Culicidae) diversity in Pakistan by DNA barcoding. *PLoS ONE*, 9, e97268.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097268>
- Barajas, J., Suaza, J.D., Torres, C., Rua-Urbe, G., Uribe, S. & Porter, C.H. (2013) Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39, 132–140.
- Bargues, M., Morchón, R., Latorre, J., Cancrini, G., Mas-Coma, S. & Simón, F. (2006) Ribosomal DNA second internal transcribed spacer sequence studies of culicid vectors from an endemic area of *Dirofilaria immitis* in Spain. *Parasitology Research*, 99, 205–213.
<https://doi.org/10.1007/s00436-005-0107-6>
- Barratt, B., Derrai, J., Rufaut, C., Goodman, A. & Dickinson, J. (2003) Morphospecies as a substitute for *Coleoptera* species identification, and the value of experience in improving accuracy. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 33, 583–590.
<https://doi.org/10.1080/03014223.2003.9517746>
- Batovska, J., Blacket, M., Brown, K. & Lynch, S. (2016) Molecular identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in southeastern Australia. *Ecology and Evolution*, 6, 3001–3011.
<https://doi.org/10.1002/ece3.2095>
- Belkin, J.N., Schick, R.X., Galindo, P. & Aitken, T.H. (1969) Mosquito studies (Diptera: Culicidae) I. a project for a systematic study of the mosquitoes of Middle America. *Contributions of the American Entomological Institute*, 1 (2), 1–17.
- Berlin, O. (1969) Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XII. A revision of the Neotropical subgenus *Howardina* [sic] of *Aedes* [sic]. *Contributions of the American Entomological Institute*, 4 (2), 1–190.
- Bickford, D., Lohman, D., Sodhi, N., Ng, P., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. & Das, I. (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 148–155.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Blaxter, M.L. (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 359, 669–679.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1447>
- Bourke, B., Oliveira, T., Suesdek, L., Bergo, E. & Sallum, M. (2013) A multi-locus approach to barcoding in the *Anopheles strodei* subgroup (Diptera: Culicidae). *Parasites & Vectors*, 6, 111.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-111>
- Bram, R.A. (1967) Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera, Culicidae). *Proceedings of the United States National Museum Archives*, 120, 1–122.
<https://doi.org/10.5479/si.00963801.120-3557.1>
- Buhay, J.E. (2009) “COI-like” sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29, 96–110.
<https://doi.org/10.1651/08-3020.1>
- Castrillón, J., Carlos, J. & Urcuqui, S. (2015) Dengue en Colombia, diez años de evolución. *Revista Chilena de Infectología*, 32, 142–149.
<https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300002>
- Ceretti-Junior, W., Christie, R., Rizzo, M., Strobel, R., Junior, M., Mello, M., Fernandes, A., Medeiros-Sousa, A., Carvalho, G. & Marrelli, M. (2016) Species composition and ecological aspects of immature mosquitoes (Diptera: Culicidae) in

- bromeliads in urban parks in the city of São Paulo, Brazil. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 10, 102–112.
- Cienfuegos, A.V., Rosero, D.A., Naranjo, N., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2011) Evaluation of a PCR-RFLP-ITS2 assay for discrimination of *Anopheles* species in northern and western Colombia. *Acta Tropica*, 118, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.004>
- Collins, F.H. & Paskewitz, S.M. (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1996.tb00034.x>
- Conn, J., Moreno, M., Saavedra, M., Bickersmith, S., Knoll, E., Fernandez, R., Vera, H., Burrus, R., Lescano, A., Sanchez, J., Rivera, E. & Vinetz, J. (2013) Molecular Taxonomy of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* (Diptera: Culicidae) and Malaria Epidemiology in Southern Amazonian Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88, 319–324. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0429>
- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Demari-Silva, B., Vesgueiro, F., Sallum, M. & Marrelli, M. (2011) Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *Journal of Medical Entomology*, 48, 272–279. <https://doi.org/10.1603/ME09293>
- Dupuis, J., Roe, A. & Sperling, F. (2012) Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Molecular Ecology*, 21, 4422–4436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05642.x>
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- Feo, O., Solano, E., Beingolea, L., Aparicio, M. & Villagra, M. (2009) Cambio climático y salud en la Región Andina. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26, 83–93.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A. & Blaxter, M. (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11, 839–850. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01485.x>
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Forattini, O. (2002) *Culicidología médica: identificación, biología, epidemiología. Vol.2*. Editora Universidade de São Paulo, São Paulo, 860 pp.
- Friedrich, M. & Tautz, D. (1997) Evolution and phylogeny of the Diptera: a molecular phylogenetic analysis using 28S rDNA sequences. *Systematic Biology*, 46, 674–698. <https://doi.org/10.1093/sysbio/46.4.674>
- Galvis, A.G. (1943) Biología y distribución geográfica de los anofelinos en Colombia. *Reimpreso de la Revista de la Facultad de Medicina. Editorial Cromos, Bogotá*, 12, 5–55.
- Githoko, A., Lindsay, S., Confalonieri, U & Patz, J. (2009) El cambio climático y las enfermedades transmitidas por vectores: un análisis regional. *Revista Virtual REDESMA*, 3, 21–38.
- Gómez, G., Jaramillo, L. & Correa, M.M. (2013) Wing geometric morphometrics and molecular assessment of members in the *Albitarsis* Complex from Colombia. *Molecular Ecology Resources*, 13, 1082–1092. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12126>
- Gómez, G.F., Bickersmith, S.A., González, R., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2015) Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the Neotropical *Arribalzagia* Series. *PLoS ONE*, 10, e0119488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119488>
- González, R. & Carrejo, N. (2009) *Introducción al estudio taxonómico de Anopheles de Colombia: claves y notas de distribución. Segunda Edición*. Programa Editorial Universidad de Valle, Cali, 209 pp.
- González, R., Carrejo, N., Wilkerson, R.C., Alarcon, J., Alarcon-Ormasa, J., Ruiz, F., Bhatia, R., Loaiza, J. & Linton, Y.-M. (2010) Confirmation of *Anopheles* (*Anopheles*) *calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 1001–1009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000800009>
- Gutiérrez, L.A., González, J.J., Gómez, G.F., Castro, M.I., Rosero, D.A., Luckhart, S., Conn, J.E. & Correa, M.M. (2009) Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in the states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1117–1124. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000800008>
- Hajibabaei, M., Janzen, D., Burns, J., Hallwachs, W. & Hebert, P. (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 968–971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510466103>

- Harbach, R. (2017) Culicidae classification [Internet]. Mosquito taxonomic inventory. Accessed March 11, 2017. Available from: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/simpletaxonomy/term/6045> (accessed 17 May 2017)
- Harrison, B., Ruiz-lopez, F., Falero, G., Savage, H., Pecor, J. & Wilkerson, R. (2012) *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa, and male genitalia characters; and molecular verification. *Zootaxa*, 3218, 1–17.
- Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. & deWaard, J. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Setha, T., Min, S., Chang, M.S. & Walton, C. (2009) Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*, 10, 11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-11>
- Hoyos-López, R., Uribe-Soto, S. & Gallego-Gómez, J. (2015) Evolutionary relationships of West Nile virus detected in mosquitoes from a migratory bird zone of Colombian Caribbean. *Virology Journal*, 12, 80.
<https://doi.org/10.1186/s12985-015-0310-8>
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Jones, M., Ghoorah, A. & Blaxter, M. (2011) JMOTU and taxonator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. *PLoS ONE*, 6, e19259.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019259>
- Judd, D.D. (1998) Review of a bromeliad-ovipositing lineage in *Wyeomyia* and the resurrection of *Hystatomyia* (Diptera: Culicidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91, 572–589.
<https://doi.org/10.1093/aesa/91.5.572>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647–1649.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Keller, A., Schleicher, T., Schultz, J., Müller, T., Dandekar, T. & Wolf, M. (2009) 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 430, 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.10.012>
- Khoshdel-Nezamih, F., Vatandoost, H., Oshaghi, M., Azari-Hamidian, S., Mianroodi, R., Dabiri, F., Bagheri, M., Terenius, O. & Chavshin, A. (2016) Molecular characterization of mosquitoes (Diptera: Culicidae) of northwestern Iran using rDNA-ITS2. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 69, 319–322.
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.269>
- Krishna-Krishnamurthy, P. & Francis, R. (2012) A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation*, 21, 1901–1919.
<https://doi.org/10.1007/s10531-012-0306-2>
- Lane, J. (1953) *Neotropical Culicidae. Vols I and II*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 548 pp.
- Levi-Castillo, R. (1954) The *Haemagogus* of South America (Diptera: Culicidae). *Revista Ecuatoriana de Entomología y Parasitología*, 2, 269–302.
- López-Rubio, A., Suaza-Vasco, J., Marcet, P., Ruiz-Molina, N., Cáceres, L., Porter, C. & Uribe, S. (2016) Use of DNA barcoding to distinguish the malaria vector *Anopheles neivai* in Colombia. *Zootaxa*, 4175 (4), 377–389.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4175.4.7>
- Louton, J., Gelhaus, J. & Bouchard, R. (1996) The aquatic macrofauna of water-filled bamboo (Poaceae: Bambusoideae: *Guadua*) internodes in a Peruvian lowland tropical forest. *Biotropica*, 28, 228–242.
<https://doi.org/10.2307/2389077>
- Masters, B., Fan, V. & Ross, H. (2011) Species delimitation—a geneious plugin for the exploration of species boundaries. *Molecular Ecology Resources*, 11, 154–157.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02896.x>
- Mattingly, P. (1971) Contributions to the mosquito fauna of Southeast Asia. – XII. Illustrated keys to the genera of mosquitoes. *Contributions of the American Entomological Institute*, 7 (4), 1–84.
- Monaghan, M.T., Balke, M., Gregory, T.R. & Vogler, A.P. (2005) DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 360, 1925–1933.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1724>
- Motta, M. & Lourenço-de-Oliveira, R. (2000) The Subgenus *Dendromyia* Theobald: a review with redescriptions of four species (Diptera: Culicidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 649–683.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000500011>
- Müller, G. & Marcondes, C. (2006) Bromeliad-associated mosquitoes from Atlantic forest in Santa Catarina Island, southern Brazil (Diptera, Culicidae), with new records for the State of Santa Catarina. *Iheringia Série Zoologia*, 96, 315–319.
<https://doi.org/10.1590/S0073-47212006000300007>

- Naranjo-Díaz, N., Altamiranda, M., Luckhart, S., Conn, J. & Correa, M. (2014) Malaria vectors in ecologically heterogeneous localities of the Colombian Pacific region. *PLoS ONE*, 9, e103769.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103769>
- Navarro, J., Liria, J., Piñango, H. & 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., Del Ventura, F., Zorrilla, A. & Liria, J. (2010) Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) en Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 58, 245–254.
<http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v58i1.5206>
- Ng'endo, R.N., Osiemo, Z.B. & Brandl, R. (2013) DNA barcodes for species identification in the hyperdiverse ant genus *Pheidole* (Formicidae: Myrmicinae). *Journal of Insect Science*, 13, 27. [online]
<https://doi.org/10.1673/031.013.2701>
- Ortega-Morales, A., Zavortink, T., Huerta-Jimenez, H., Sanchez-Ramos, F., Teresa Valdes-Perezgasga, M., Reyes-Villanueva, F., Siller-Rodriguez, Q. & Fernandez-Salas, I. (2015) Mosquito records from Mexico: the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Tamaulipas State. *Journal of Medical Entomology*, 52, 171–184.
<https://doi.org/10.1093/jme/tju008>
- Pecor, J. & Gaffigan, T. (1997) Collecting, rearing, preserving, mounting and shipping techniques for mosquitoes [Internet]. Walter Reed Biosystematics Unit, Washington, DC. Accessed February 17, 2014. Available from: <http://wrbu.si.edu/Techniques.html> (accessed 17 May 2017)
- Pemola Devi, N. & Jauhari, R. (2004) Altitudinal distribution of mosquitoes in mountainous area of Garhwal region: Part-I. *Journal of Vector Borne Diseases*, 41, 17–26.
- Pinault, L. & Hunter, F. (2011) New highland distribution records of multiple *Anopheles* species in the Ecuadorian Andes. *Malaria Journal*, 10, 236.
<https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-236>
- Prado, M. (2003) *Caracterización morfológica y molecular de tres especies del subgénero Kerteszia de Anopheles (Diptera: Culicidae) en la región andina venezolana*. Trabajo Especial de Grado, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 50 pp.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. (2012) ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21, 1864–1877.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Quintero, J., Brochero, H., Manrique-Saide, P., Barrera-Pérez, M., Basso, C., Romero, S., Caprara, A., De Lima Cunha, J., Beltrán-Ayala, E., Mitchell-Foster, K., Kroeger, A., Sommerfeld, J. & Petzold, M. (2014) Ecological, biological and social dimensions of dengue vector breeding in five urban settings of Latin America: a multi-country study. *BMC Infectious Diseases*, 14, 38.
<https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-38>
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. (2013) A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system. *PLoS ONE*, 8, e66213.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. (2007) The Barcode of Life Data System BOLD. *Molecular Ecology Notes*, 7, 355–364.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Rosenberg, N. (2007) Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. *Evolution*, 61, 317–323.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00023.x>
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19, 2496–2497.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg359>
- Rozo-Lopez, P. & Mengual, X. (2015) Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *ZooKeys*, 513, 39–64.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.513.9561>
- Rubioff, D. (2006) Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*, 20, 1026–1033.
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00372.x>
- Ruiz-López, F., González-Mazo, A., Vélez-Mira, A., Gómez, G., Zuleta, L., Uribe, S. & Vélez-Bernal, I.D. (2016) Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomédica*, 36, 303–308.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301>
- Rutar, T., Baldomar Salgueiro, E.J. & Maguire, J.H. (2004) Introduced *Plasmodium vivax* malaria in a Bolivian community at an elevation of 2,300 meters. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 15–19.
- Ryberg, M. (2015) Molecular operational taxonomic units as approximations of species in the light of evolutionary models and empirical data from Fungi. *Molecular Ecology*, 24, 5770–5777.
<https://doi.org/10.1111/mec.13444>
- Santacoloma-Varón, L., Chaves-Córdoba, B. & Brochero, H. (2010) Susceptibilidad de *Aedes aegypti* a DDT, deltametrina y lambdacialotrina en Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 27, 66–73.
<https://doi.org/10.1590/s1020-49892010000100010>

- Song, H., Buhay, J.E., Whiting, M.F. & Crandall, K.A. (2008) Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 13486–13491.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0803076105>
- Stone, A. (1944) Notes on the genus *Trichoprosopon* (Diptera, Culicidae). *Revista de Entomologia*, 15, 335–341.
- Suaza-Vasco, J., López-Rubio, A., Galeano, J., Uribe, S., Vélez, I. & Porter, C. (2015) The sabethines of northern Andean coffee-growing regions of Colombia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 31, 125–134.
<https://doi.org/10.2987/14-6466R>
- Suaza-Vasco, J., Ruiz-Molina, N., Galeano, E., Lopez, A., Uribe, S. & Porter, C. (2013a) Evidencia molecular de presencia de *Anopheles (Kerteszia)* grupo boliviensis (Diptera: Culicidae) en reserva ecológica Alto Romeral departamento de Antioquia, Colombia. *Entomotropica*, 28, 160.
- Suaza-Vasco, J., Ruiz-Molina, N., Uribe, S. & Porter, C. (2013b) Contribución al conocimiento de *Anopheles (Kerteszia)* grupo “boliviensis” (Diptera: Culicidae) en Colombia: Taxonomía y variabilidad genética. *Entomotropica*, 28, 160.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Wesson, D., Porter, C. & Collins, F. (1992) Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1, 253–269.
[https://doi.org/10.1016/1055-7903\(92\)90001-W](https://doi.org/10.1016/1055-7903(92)90001-W)
- Wilkerson, R., Linton, Y., Fonseca, D., Schultz, T., Price, D. & Strickman, D. (2015) Making mosquito taxonomy useful: a stable classification of Tribe Aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships. *PLoS ONE*, 10, e0133602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133602>
- Wolff, M., Niehi, S. & de Carvalho, C. (2016) Catalogue of Diptera of Colombia: an introduction. *Zootaxa*, 4122 (1), 8–14.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4122.1.3>
- WRBU (2017) Systematic catalog of Culicidae [Internet]. Walter Reed Biosystematics Unit [accessed March 13, 2017]. Available from: <http://www.mosquitocatalog.org> (accessed 17 May 2017)
- Zavortink, T. (1979) Mosquito studies (Diptera, Culicidae) XXXV. The new sabethine genus *Johnbelkinia* and a preliminary reclassification of the composite genus *Trichoprosopon*. *Contributions of the American Entomological Institute*, 17 (1), 1–61.

Molecular detection of Eastern Equine Encephalitis virus in mosquitoes from La Pintada (Antioquia)

Detección molecular del virus de Encefalitis Equina del Este en mosquitos de La Pintada (Antioquia)

Richard Hoyos L,^{1,2} M.Sc, Juan Suaza V,² M.Sc, Antonio Tenorio,³ Ph.D, Sandra Uribe,² Ph.D, Juan Gallego-Gómez,^{1*} Ph.D.

¹Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina, Grupo de investigación en Medicina Molecular y de Traslación. Carrera 51D Nro. 62-29, Medellín, Colombia. ²Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, Escuela de Biociencias, Grupo de investigación en Sistemática Molecular. Calle 59A Nro. 63-20, Medellín, Colombia. ³Instituto de Salud - Carlos III. Ctra de Majadahonda-Pozuelo Km 2.2, Madrid, España. *Correspondencia: juanc.gallegomez@gmail.com

Received: September 2014; Accepted: February 2015.

ABSTRACT

Objective. The detection of emerging and re-emerging arboviruses in mosquitoes from urban and rural areas, is fundamental for predict possible epidemic outbreaks in human populations. The Municipality of La Pintada (Antioquia), is characterized by the presence of dry tropical forest relicts, fishing, tourism, farms and mining. An entomological research was performed for explore the possible circulation of arboviruses of public health importance. **Materials and methods.** Mosquitoes were captured in urban and rural sites in February-April of 2012. The specimens were stored in liquid nitrogens tanks and were grouped using taxonomic keys for genera. RNA extraction from pools and generic/nested RT-PCR was performed for *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus* (Group Bunyamwera) and *Phlebovirus*. **Results.** 1274 mosquitoes were collected, mainly belonging to *Culex* and *Aedes* genera. RNA extracts of 64 pools were tested by RT-PCR and one pool was positive for *Alphavirus*. Sequencing of the RT-PCR product and the analysis with sequences storage in GenBank designate the presence of *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV). **Conclusions.** This is the first record of natural infection from EEEV in mosquitoes from La Pintada (Antioquia), an area with ecological elements that favor the emergence of emerging and re-emerging arboviruses of medical and veterinarian importance.

Key words: Arboviruses, *Culicidae*, *Eastern Equine Encephalitis virus*, Neighbor-joining, RT-PCR (Source: MESH, CAB).

RESUMEN

Objetivo. La detección de arbovirus emergentes y re-emergentes a partir de mosquitos provenientes de áreas semi-urbanas y rurales es fundamental para predecir posibles eventos epidémicos en poblaciones humanas. En el municipio de La Pintada (Departamento de Antioquia), caracterizado por la presencia de remanentes de bosque seco tropical, actividades de pesca, turismo, explotación agropecuaria y minera, se realizó un estudio entomológico para explorar la posible presencia y circulación de arbovirus de importancia en salud pública. **Materiales y métodos.** Los mosquitos adultos fueron recolectados en sitios urbanos y rurales en febrero-abril del año 2012. Los especímenes colectados fueron almacenados en tanques de nitrógeno líquido, y luego separados en grupos utilizando claves taxonómicas para género. Para la detección de los virus se realizó extracción de RNA y RT-PCR genérica/anidada para los géneros *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus* (Grupo Bunyamwera) y *Phlebovirus*.

Resultados. 1274 mosquitos adultos e inmaduros fueron colectados, pertenecientes en su mayoría a los géneros *Culex* y *Aedes*. Los extractos de RNA de 64 pools fueron evaluados por RT-PCR. Se encontró un pool positivo para *Alphavirus*. La secuenciación de los productos de RT-PCR y el análisis con secuencias depositadas en GenBank indica la presencia del virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV). **Conclusiones.** Este es el primer registro de infección natural del virus de encefalitis equina del este (EEEV) en mosquitos de La Pintada (Antioquia, Colombia), un área con factores ecológicos aptos para la emergencia y re-emergencia de arbovirus de importancia veterinaria y médica.

Palabras clave: Arbovirus, *Culicidae*, EEEV, Neighbor-joining, RT-PCR (Fuentes: MESH, CAB).

INTRODUCTION

Between 1940 and 2004 close to 300 events of emerging diseases were identified in humans around the globe and only in the last 30 years 100 new viruses implicated in new viral diseases have been recognized (1). Most of these considered pathogens introduced in new host populations (emerging), or those that expand quickly in their geographic distribution range, with a corresponding increase of cases and epidemic outbreaks (1,2). In terms of public health, the most important emerging viruses are the arbovirus (arthropod-borne viruses) transmitted by mosquitoes because they cause viremia in humans, encephalitis and hemorrhagic fevers. These viruses belong to three main families: *Togaviridae*, *Flaviviridae* and *Bunyaviridae* (1,2).

In Colombia, the presence of arbovirus in mosquitoes, vertebrate hosts and infected humans, or with serological contact evidence, has been recorded for *Alphavirus* (Encephalitis Venezuelan Equine, Encephalitis Equine East, Mayaro), *Flavivirus* (Dengue, Yellow fever, Virus of the West of the Nile, encephalitis of Saint Louis) and *Orthobunyavirus* (Guaroa, Wyeomyia) (3-7).

The high diversity of mosquitos of the *Haemagogus*, *Aedes* and *Culex* genera (subgenera *Melanoconion* and *Culex*) (3,4,6), the fragmentation of the natural ecosystems and the presence of vertebrate hosts in different areas of the Colombian geography (4) have favored the human-vector-arbovirus contact; increasing the probability of epidemic outbreaks of emerging and re-emerging diseases (3,4,6). In this context, the tracking of viruses in potential mosquito vectors is an important step in the prevention and future control of viral diseases. The objective of this study was to track the natural infection by arbovirus of the *Alphavirus*, *Flavivirus*, *Phlebovirus* and *Bunyamwera* group genera (*Orthobunyavirus*) in mosquitos of the municipality of La Pintada by a RT-PCR for each viral genera and a nested RT-PCR for sequencing and identification of the present virus.

INTRODUCCIÓN

Entre 1940 y 2004, cerca de 300 eventos de enfermedades emergentes fueron identificados en humanos alrededor del mundo y solamente en los últimos 30 años han sido reconocidos 100 nuevos virus implicados en nuevas enfermedades virales (1). La mayoría son considerados patógenos introducidos en nuevas poblaciones de hospederos (emergencia), o aquellos que rápidamente expanden su rango de distribución geográfica, con un correspondiente incremento de casos y brotes epidémicos (1,2). En términos de salud pública, los virus emergentes más importantes son arbovirus (arthropod-borne viruses) transmitidos por mosquitos, debido a que causan viremia en humanos, encefalitis y fiebres hemorrágicas, perteneciendo a tres familias principalmente: *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Bunyaviridae* (1,2).

En Colombia, la presencia de arbovirus en mosquitos, hospederos vertebrados y humanos infectados, o con evidencia serológica de contacto, ha sido registrada para *Alphavirus* (Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis Equina del Este, Mayaro), *Flavivirus* (Dengue, Fiebre amarilla, Virus del Oeste del Nilo, encefalitis de Saint Louis) y *Orthobunyavirus* (Guaroa, Wyeomyia) (3-7).

La alta diversidad de mosquitos de los géneros *Haemagogus*, *Aedes* y *Culex* (subgéneros *Melanoconion* y *Culex*) (3,4,6), la fragmentación de los ecosistemas naturales y la presencia de hospederos vertebrados en diferentes áreas de la geografía colombiana (4), han favorecido el contacto humano-vector-arbovirus; aumentando la probabilidad de brotes epidémicos de enfermedades emergentes y re-emergentes (3,4,6). En este contexto, el rastreo virológico en mosquitos vectores potenciales, constituye un importante paso en la prevención y futuro control de enfermedades virales. El objetivo de este estudio fue rastrear la infección natural por arbovirus de los géneros *Alphavirus*, *Flavivirus*, *Phlebovirus* y grupo *Bunyamwera* (*Orthobunyavirus*) en mosquitos del municipio de La Pintada mediante una RT-PCR para cada género viral y RT-PCR anidada para secuenciación e identificación de virus presente.

MATERIALS AND METHODS

Capture of mosquitoes. The entomological collections were conducted in February and April 2012 in the municipality of La Pintada (Antioquia, Colombia), (geographic coordinates: 5°44'25.63" N, 75°36'20.18" O). The adult mosquitoes were captured using CDC light traps with carbon dioxide baits (CO₂) for 13 hours (5:00PM-6:00AM) per day, as well as active search using vacuums in rural area forest fragments and in the peridomicile of the urban area. For the case of the immature states (larvae and pupas), the mosquitoes were captured using pipettes together with the water from the breeding grounds that were identified. The captured mosquitoes were transported in liquid nitrogen tanks to the Biology and Systemic lab of the National University of Colombia, Medellín campus. The mosquitoes were grouped in pools of 2-20 individuals according to their external morphologic characteristics to separate genera, place and date of capture.

Molecular detection. Each pool was mechanically marked with a plastic mortar in an Eppendorf tube with RLT buffer and the total RNA was extracted using a commercial kit RNeasy (Qiagen, Valencia). The chain reaction of the polymerase prior to inverse transcription for viral genera (generic RT-PCR), was performed with the One-Step RT-PCR (Qiagen, Valencia) kit, using the RNA extracts that belong to the mosquito pools; and the nested RT-PCR was performed from the positive cDNA for the generic RT-PCR, using the protocols previously described for Alphavirus (8), Flavivirus (9), Phlebovirus (10) and Orthobunyavirus (11).

Sequence analysis. The positive PCR products both for the generic and the nested RT-PCR were sequenced following the Sanger en Macrogen (Korea) method. The sequences obtained were edited in BioEdit7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and aligned in CLUSTALW with sequences of the viral group detected available in the Genbank database, prior to their identification by nucleotide similarity using the BLASTN algorithm available in NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Maximum Likelihood (ML) was used for the alignment for the reconstruction of a phylogenetic tree with the PHYMLv6.0 software to identify the identity of the viral sequences detected.

RESULTS

A total of 64 pools formed from 1274 adult mosquitoes were evaluated. 84% corresponded to individuals of the *Culex* and *Aedes* genera and in less quantity, the *Coquilletidia*, *Mansonia*, *Psorophora* and *Anopheles* genera were found. A pool corresponding to the mosquitoes of the *Culex*

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de mosquitos. Las recolecciones entomológicas fueron realizadas en febrero y abril del 2012 en el municipio de La Pintada (Antioquia, Colombia), (coordenadas geográficas: 5°44'25.63"N, 75°36'20.18"O). Los mosquitos adultos fueron colectados usando trampas de luz CDC con cebo de dióxido de carbono (CO₂) por 13 horas (5:00PM-6:00AM) por día. Así como búsqueda activa, utilizando aspiradores bucales en fragmentos de bosque del área rural, y en el peridomicilio del área urbana. Para el caso de los estados inmaduros (larvas y pupas), se recolectaron usando pipetas para removerlos junto con el agua de los criaderos identificados. Los mosquitos colectados fueron transportados en tanque de nitrógeno líquido hasta el laboratorio de Biología y Sistemática de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Los mosquitos se agruparon en pools de 2-20 individuos considerando las características morfológicas externas para separar géneros, el lugar y fecha de recolecta.

Detección molecular. Cada pool fue macerado mecánicamente con un mortero plástico, en un tubo Eppendorf con buffer RLT, y el RNA total fue extraído usando el kit comercial RNeasy (Qiagen, Valencia). La reacción en cadena de la polimerasa previa transcripción inversa para géneros virales (RT-PCR genérica), fue realizada con el kit One-Step RT-PCR (Qiagen, Valencia), usando los extractos de RNA pertenecientes a los pools de mosquito, y la RT-PCR anidada se realizó a partir del cDNA positivo para la RT-PCR genérica, usando los protocolos previamente descritos para Alphavirus (8), Flavivirus (9), Phlebovirus (10) y Orthobunyavirus (11).

Análisis de secuencias. Los productos de PCR positivos tanto de la RT-PCR genérica y anidada fueron secuenciados siguiendo el método de Sanger en Macrogen (Corea). Las secuencias obtenidas fueron editadas en BioEdit7.0.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y alineadas en CLUSTALW, con secuencias de del grupo viral detectado disponibles en la base de datos Genbank, previa identificación por similitud nucleotídica usando el algoritmo BLASTN disponible en NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El alineamiento fue usado para la reconstrucción, de un árbol filogenético por Máxima Verosimilitud (ML) con el software PHYMLv6.0, para identificar la identidad de las secuencias virales detectadas.

RESULTADOS

Un total de 64 pools conformados a partir de 1274 mosquitos adultos fueron evaluados. El 84% correspondió a individuos del género *Culex* y *Aedes*,

genera that was captured in the urban area was positive for the generic RT-PCR and for the nested RT-PCR for the detection of the Alphavirus and the specific viral identification (8). The resulting sequence of 147 nt that originated from the nested RT-PCR allowed for its identification as an Eastern Equine Encephalitis Virus (EEEV), based on the similarity obtained with the BLASTN algorithm (99% of similarity). The virus detected appears included as a complex formed by two species: Eastern Equine Encephalitis *sensu stricto* and Madariaga virus (MADV). The latter with three lineages that group isolated strains in South America.

To determine specifically the identity of the virus, a sequence obtained from the generic RT-PCR for the Alphavirus was used because it presents greater length and variability (Genbank access number: KC802112), and the sequences available in GenBank for Alphavirus EEEV and MADV. The alignment from the 311 nt fragment of the NSP4 gene (Non-structural Protein 4 - subunit RNA-dependent of polymerase viral RNA) and subsequent phylogenetic reconstruction for Maximum Likelihood identifies the detected virus as EEEV - lineage I (Figure 1), differentiating it from the MADV with high bootstrapp values (>90).

Pools of mosquitoes evaluated were 64, including 1274 individuals (adults and immature), from which a minimum infection rate of 0,784 could be

y en menor abundancia se encontraron los géneros *Coquilletidia*, *Mansonia*, *Psorophora* y *Anopheles*. Un pool correspondiente a mosquitos del género *Culex* colectados en el área urbana fue positivo para la RT-PCR genérica y la RT-PCR anidada para la detección de Alphavirus e identificación específica viral (8). La secuencia resultante de 147 nt proveniente de la RT-PCR anidada, permitió identificarla como virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV), con base en la similitud obtenida en el algoritmo BLASTN (99% de similitud). El virus detectado aparece incluido en un complejo conformado por dos especies: Encefalitis Equina del Este *sensu stricto* y Madariaga virus (MADV), este último con tres linajes que agrupan cepas aisladas en Suramérica.

Para determinar específicamente la identidad del virus, se utilizó la secuencia obtenida de la RT-PCR genérica para Alphavirus por presentar mayor longitud y variabilidad (número de acceso a Genbank: KC802112), y las secuencias disponibles en GenBank para los Alphavirus EEEV y MADV. El alineamiento a partir del fragmento de 311 nt del gen NSP4 (Non-structural Protein 4 - subunidad RNA-dependiente de la RNA polimerasa viral) y posterior reconstrucción filogenética por Máxima Verosimilitud identifica al virus detectado como EEEV - linaje I (Figura 1), diferenciándolo del MADV con altos valores de bootstrapp (>90).

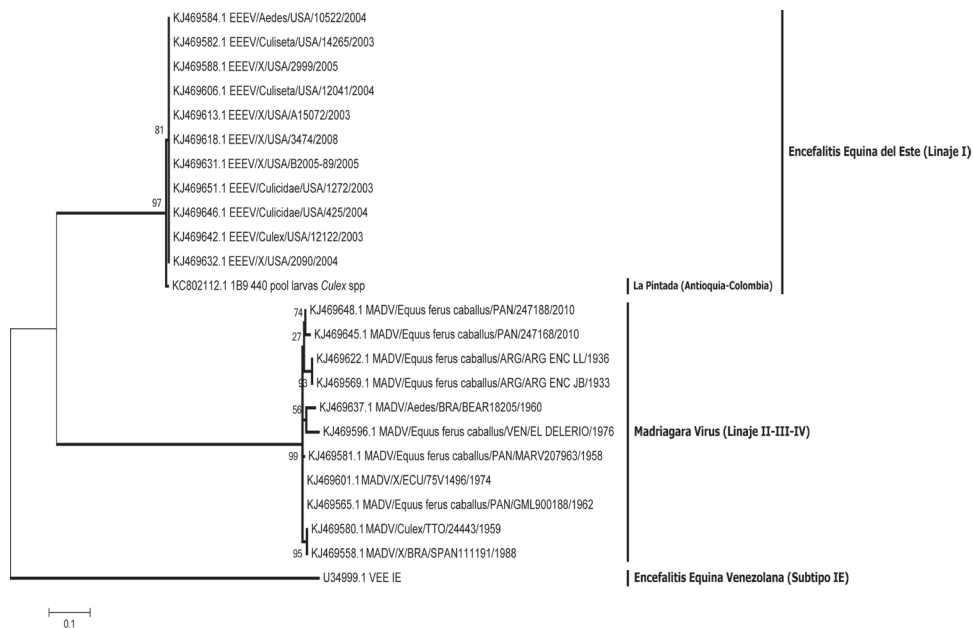


Figure 1. Tree with Maximum Likelihood (ML) estimated with partial sequences of nsP4 (311 nt) belonging to the Eastern Equine Encephalitis complex (EEEV *sensu-stricto* and Madariaga virus-MADV) and the positive pool detected in La Pintada. For the reconstruction by ML the GTR+I+G inferred in JMODELTESTV2.1.4 (- Ln=1047.84, Akaike=2207.68 Criterion) model was used and 1000 copies of bootstrap (values in branches). In front of each sequence used the GenBank access number is observed.

inferred (12). The occurrence of false positives in the molecular detection was excluded by genomic sequence evaluation of all the potential sources of Alphavirus in our lab and the positive control used for these genera was Venezuelan Equine Encephalitis (Rio Negro virus).

DISCUSSION

The molecular detection of the Eastern Equine Encephalitis Virus (EEEV) in this study of emerging arbovirus is the first report for Antioquia of the natural infection in mosquitoes. The epidemiology of EEEV has not been studied in depth and in general, only equine cases are recorded annual since human cases are rare (4,13) with the exception of the plague recorded in the province of the Darien - Panama (14).

The natural infection of mosquitoes with EEEV in South America has been associated with species of the *Culex (Melanoconion)* - Spissipes Section subgenera like *Culex taeniopus*, *Culex ocosa* and *Culex pedroi* (15), suggesting that it is the main agent for transmission to small mammals and birds in enzootic foci, and in second place the *Mansonia* spp., and *Aedes fulvus* (3-4,6); however, the taxonomic determination of the species belonging to the *Melanoconion* subgenera is not very precise and complex because of its morphological similarity with the species that belong to the group (6,15).

The circulation of EEEV in Colombia was reported for the first time as serologic evidence in two monkeys ("spider monkeys" - *Ateles* sp, "capuchin monkey" - *Cebus* sp) in San Vicente del Chucurí (Santander). However, there are prior records of activity in jungle areas of the Magdalena Medio region (personal communication from Downs 1961 cited by Groot 1964). Subsequent viral activity has been found in other areas of Colombia like Casanare, Boyaca, Caribbean coast, isolating them from horses and hamsters (4). There are records of an EEEV plague in 1992 that originated 13 fatal cases in equines in Antioquia (4), considering this region a high risk area because of the presence of the virus, competent mosquito species, environmental factors and the presence of areas dedicated to bovine/equine breeding.

The presence of EEEV lineage I *sensu stricto* in La Pintada - Antioquia, adds to the evidence of the diversity of circulating strains in different geographic areas of Colombia; it also suggests the viral exchange between North and South America. Similar evidence is the isolation of two South American strains of EEEV from migratory birds in Mississippi (USA) (13). However, it is

Los pools de mosquitos evaluados fueron 64, incluyendo 1274 individuos (adultos e inmaduros), con base en lo cual podría hablarse de una tasa de infección mínima de 0,784 (12). La ocurrencia de falsos positivos en la detección molecular, fue excluida por evaluación de secuencias genómicas de todas las potenciales fuentes de Alphavirus en nuestro laboratorio, y el control positivo usado para este género fue Encefalitis Equina Venezolana (Río Negro virus).

DISCUSIÓN

La detección molecular del Virus de Encefalitis Equina del Este (EEEV), en este estudio de arbovirus emergentes, es el primer reporte para Antioquia de infección natural en mosquitos. La epidemiología de EEEV es poco estudiada, y en general se registran anualmente sólo los casos equinos, dado que los casos humanos son escasos (4,13), con excepción de la epidemia registrada en la provincia del Darién - Panamá (14).

La infección natural de mosquitos con EEEV en Suramérica, se ha asociado generalmente con especies del subgénero *Culex (Melanoconion)* - Sección Spissipes como *Culex taeniopus*, *Culex ocosa* y *Culex pedroi* (15), sugiriéndose como el agente principal de la transmisión en pequeños mamíferos y aves en focos enzoóticos, participando secundariamente *Mansonia* spp., y *Aedes fulvus* (3-4,6); no obstante, la determinación taxonómica de la especies pertenecientes al subgénero *Melanoconion* es poco precisa y compleja por la similitud morfológica de las especies que lo conforman (6,15).

La circulación de EEEV en Colombia fue reportada por primera vez con evidencia serológica en dos monos ("mono araña" - *Ateles* sp, "mono capuchino" - *Cebus* sp) en San Vicente del Chucurí (Santander). Sin embargo existen algunos registros previos de actividad en zonas selváticas del Magdalena medio (comunicación personal de Downs 1961 citado por Groot 1964) (3). Posteriormente actividad viral ha sido encontrada en otras áreas de Colombia como Casanare, Boyacá, costa Caribe, aislándose de caballos y hámster (4). En el departamento de Antioquia, existen registros de una epidemia de EEEV en 1992 que originó 13 casos fatales en equinos (4), considerándose una zona de riesgo por la presencia del virus, especies de mosquitos competentes, factores ambientales y la presencia de áreas dedicadas al ganado bovino/equino.

La presencia del linaje I de EEEV *sensu stricto* en La Pintada - Antioquia, suma evidencia en relación con la diversidad de cepas circulando, en diferentes áreas geográficas de Colombia; además, sugiere intercambio viral entre Norte y Suramérica.

desirable to characterize additional sequences of the virus to precise possible substitution and adaptation events that would possibly generate more biological efficiency in new hosts and as a consequence, affect the virulence, which would impact the ecology of the hosts and vectors that allow for the viral emergence in human populations (14) and therefore, originate clinical-pathogenic symptoms in humans; also, it is necessary to determine the presence of other EEEV lineages in La Pintada. Recently, the taxonomy of the EEEV complex has been reviewed through phylogenomic analysis and it has been separated in two species: EEEV *sensu stricto* (lineage I) and Madariaga virus (MADV). The South American strains are found in the latter, which belong to the II-III-IV lineages of the complex (15).

Subsequent entomological works of authors using classic and molecular taxonomy: genetic bar code (cytochrome c oxidase I), have allowed for the identification of mosquito species in the same area of this study, with prior records of natural infection with EEEV and the Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEEV), among other arbovirus of medical interest. These species are *Culex nigripalpus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Psorophora ferox*, *Ochlerotatus* spp. (Unpublished data).

The detection of low rates of natural infection with EEEV in mosquitoes together with the presence of bovine/equine cattle, potential vector species and the possible role of equines in the amplification of the detected virus, allow proposing this area as a risk area for the emergence of this arbovirus. It is important to consider the high evolutionary proximity of the detected virus with North American strains of the virus belonging to lineage I or EEEV *sensu stricto*. Additionally, it is relevant to perform a detailed inventory of the possible vertebrate reservoirs (birds and small mammals), as well as a serologic/clinical survey to identify the circulation of the virus in humans and to identify the possible cases in equines and humans, which can be non-apparent in their clinical symptoms or confused with other arbovirus that circulate in the area, such as the Dengue virus or the Venezuelan Equine Encephalitis virus.

Acknowledgments

Colciencias, for the scholarship granted to Richard Hoyos Lopez (Grant-528) and the financing of this work under project 111549326198. The School of Medicine of the University of Antioquia, for granting Exclusive Dedication to Juan Carlos Gallego-Gomez. Diego Puerta for support in the captures and the lab.

Evidencia similar la constituye el aislamiento de dos cepas suramericanas de EEEV, a partir de aves migratorias en Mississippi (EEUU) (13). Sin embargo, es deseable caracterizar secuencias adicionales del virus, para precisar posibles eventos de sustitución o adaptación, que posiblemente confieran mayor eficacia biológica en nuevos hospederos y en consecuencia afectar la virulencia, impactando la ecología de hospederos y vectores que permitan la emergencia viral en poblaciones humanas (14), y en consecuencia originar cuadros clínico-patogénicos en humanos; además, se es necesario determinar la presencia de otros linajes de EEEV en La Pintada. Lo anterior dado que recientemente se ha revisado taxonómicamente el complejo EEEV, mediante análisis filogenómico y se ha separado en dos especies: EEEV *sensu stricto* (linaje I) y Madariaga virus (MADV). En este último se encuentra las cepas suramericanas, que pertenecen a los linajes II-III-IV del complejo (15).

Posteriores trabajos entomológicos de los autores usando taxonomía clásica y molecular: código de barras genético (citocromo oxidasa I), han permitido identificar en la misma zona de este estudio, especies de mosquitos con registros previos de infección natural con EEEV y el virus de la Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), entre otros arbovirus de interés médico. Estas especies son *Culex nigripalpus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Psorophora ferox*, *Ochlerotatus* spp. (Datos sin publicar).

La detección de bajas tasas de infección natural con EEEV, en mosquitos junto con la presencia de ganado bovino/equino, especies de vectores potenciales y el posible rol de los equinos en la amplificación del virus detectado, permiten postular esta zona como de riesgo para la emergencia de este arbovirus. Es importante considerar la alta cercanía evolutiva del virus detectado, con cepas norteamericanas virulentas pertenecientes al linaje I o EEEV *sensu stricto*. Adicionalmente es pertinente realizar un inventario detallado de los posibles reservorios vertebrados (aves y pequeños mamíferos), así como una encuesta serológica/clínica para identificar circulación del virus en humanos, y precisar los posibles casos en equinos y humanos, los cuales pueden ser inaparentes en sus manifestaciones clínicas o confundidos con otros arbovirus que circulan en la zona, como el virus Dengue y el virus de Encefalitis Equina Venezolana.

Agradecimientos

Colciencias, por la beca de doctorado nacional otorgada a Richard Hoyos López (Convocatoria-528) y la financiación de este trabajo bajo el proyecto 111549326198. La Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, por conceder la Dedicación Exclusiva a Juan Carlos Gallego-Gómez. Diego Puerta por asistencia en las colectas y laboratorio.

REFERENCES

1. Jones K. Global trends in emerging infectious diseases. *Nat* 2008; 451:990-993.
2. Weaver S, Reisen W. Present and Future arboviral threats. *Antiviral Res* 2010; 85(2):328-345.
3. Groot H, Morales A, Romero M, Ferro C, Prías E, Vidales H, et al. Estudios de arbovirosis en Colombia en la década de 1970. *Biomédica* 1996; 16:331-344.
4. Mesa FA, Cardenas JA, Villamil LC. Las Encefalitis Equinas en Colombia. Bogotá D.C, Editorial Universidad Nacional de Colombia; 2005.
5. Osorio J, Ciuderis K, Lopera J, Piedrahita L, Murphy D, Levasseur J et al. Characterization of west nile viruses isolated from captive American Flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87(3):565-572.
6. Ferro C, Boshell J, Moncayo A, Gonzalez M, Ahumada M, Kang W, et al. Natural Enzootic Vectors of Venezuelan equine encephalitis virus in the Magdalena Valley, Colombia. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(1):49-54.
7. Mattar S, Komar N, Young G, Alvarez J, Gonzalez M. Seroconversion for West Nile and St. Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011; 106(8):976-979.
8. Sánchez-Seco M, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *J Virol Methods* 2001; 95:153-161.
9. Sánchez-Seco M, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán M, Tenorio A. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods* 2005; 126:101-109.
10. Sánchez-Seco M, Echevarría J, Hernández L, Estévez D, Navarro-Mari J, Tenorio A. Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers. *J Med Virol* 2003; 71(1):140-149.
11. Kuno G, Mitchell C, Chang G, Smith G. Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *J Clin Microbiol* 1996; 34(5):1184-1188.
12. Gu W, Unnasch T, Katholi C, Lampman R, Novak R. Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(8):817-822.
13. Calisher C, Maness K, Lord R, Coleman P. Identification of two South American strains of Eastern equine encephalomyelitis virus from migrant birds captured on the Mississippi delta. *Am J Epidemiol* 1971; 94(2):172-178.
14. Carrera J, Forrester N, Wang E, Vittor A, Haddow A, López-Vergés S et al. Eastern equine encephalitis in Latin America. *N Engl J Med* 2013; 369(8):732-744.
15. Arrigo N, Paige A, Weaver S. Evolutionary Patterns of Eastern Equine Encephalitis Virus in North versus South America Suggest Ecological Differences and Taxonomic Revision. *J Virol* 2010; 84(2):1014-1025.

Molecular detection of flaviviruses and alphaviruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) from coastal ecosystems in the Colombian Caribbean

Richard Hoyos-López^{1/+}, Juan Suaza-Vasco², Guillermo Rúa-Uribe³,
Sandra Uribe², Juan Carlos Gallego-Gómez¹

¹Universidad de Antioquia, Translational and Molecular Medicine Group, Medellín, Antioquia, Colombia

²Universidad Nacional de Colombia, Grupo de Investigación en Sistemática Molecular, Medellín, Antioquia, Colombia

³Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina, Grupo de Entomología Médica, Medellín, Antioquia, Colombia

Arboviruses belonging to the genera Flavivirus and Alphavirus were detected in mosquitoes in a rural area of San Bernardo del Viento (Córdoba, Colombia). A total of 22,180 mosquitoes were collected, sorted into 2,102 pools, and tested by generic/nested reverse transcription-polymerase chain reaction. Venezuelan equine encephalitis virus, dengue virus, West Nile virus, St. Louis encephalitis virus, yellow fever virus, and Culex flavivirus were detected and identified by sequencing. The detection of arboviral pathogens in this zone represents possible circulation and indicates a human health risk, demonstrating the importance of virological surveillance activities.

Key words: alphavirus - flavivirus - mosquitoes - mangroves - emerging infectious diseases - molecular detection

The known mosquito-associated arboviruses in Colombia are found in three families and four genera of medically important viruses: *Flaviviridae* (*Flavivirus*), *Togaviridae* (*Alphavirus*), and *Bunyaviridae* (*Orthobunyavirus* and *Phlebovirus*) (Groot 1996, Weaver 2005). Representative pathogenic arboviruses associated with human illness in South America include the West Nile virus (WNV), dengue virus (DENV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), eastern equine encephalitis virus (EEEV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV), yellow fever virus (YFV), Zika virus (ZIKV), and Chikungunya virus (CHIKV) (Gubler 2008, Weaver & Reisen 2010). Negevirus represent another important group. These recently described viruses comprise insect-specific viruses found in mosquitoes and phlebotomine sandflies (Vasilakis et al. 2013, Auguste et al. 2014, Nunes et al. 2015).

There are historical reports of alphaviruses (VEEV, EEEV, Mayaro), flaviviruses (YFV, WNV, DENV, SLEV, Ilheus, Bussuquara), and bunyaviruses (*Anopheles* A, *Anopheles* B, Guaroa, Oya, Oropouche, Wyeomyia) in areas of the Magdalena river valley, Llanos Orientales, Gulf of Uraba, Guajira, Catatumbo, Caribbean, and Pacific coast of Colombia (Groot 1964, Prias-Landínez et al. 1968, SanMartín et al. 1971, Rivas et al.

1995, Weaver et al. 1996, 2004, Hastriter & Lawyer 1998, Ferro et al. 2003, 2008, Méndez et al. 2003, Jaramillo et al. 2005, Mattar et al. 2005a, b, 2011, Álvarez et al. 2010, Góez-Rivillas et al. 2010, Múnera et al. 2010, Osorio et al. 2012, Barrera et al. 2015, Hoyos-López et al. 2015a, b, c). Moreover, mosquitoes in the genera *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* (including subgenera *Culex* and *Melanoconion*), and *Haemagogus*, and in the tribe Sabethini are recognised as potential vectors of such viruses (Roca-García 1944, Groot 1964, Ferro et al. 2003, 2008, Jaramillo et al. 2005). Continuous ecological change, including fragmentation of natural ecosystems, may increase the probability of human-vector contact (Hastriter & Lawyer 1998, Ferro et al. 2015) and, consequently, the possibility of outbreaks of emerging and re-emerging arboviruses. Although some studies have focused on arbovirus detection in wild mosquito populations in Colombia, these reports are relatively scarce. This is despite efforts in the last few years to record potential vector mosquito species, to identify the vector species in recent arboviral outbreaks, and to validate molecular techniques for viral detection (Ferro et al. 2003, 2008, González-Reiche 2010, Parra-Henao & Suárez 2012, Barajas et al. 2013, Hoyos-López et al. 2015a, b, c).

The present study provides an update on emerging and re-emerging arboviruses in Colombia, particularly for the Caribbean coastal zone and for flaviviruses and alphaviruses. Results were obtained as a part of a multidisciplinary study conducted between 2011-2013 in San Bernardo del Viento (Córdoba department, Colombia), an area poorly studied in terms of arboviruses, despite exhibiting particular conditions such as the presence of migratory birds and other fauna that might act as viral reservoirs and recent anthropogenic activities (fragmentation of mangrove forests, expansion of rice fields, and expansion of cattle ranching) that might promote the transmission of arboviruses to humans.

doi: 10.1590/0074-02760160096

Financial support: COLCIENCIAS (grant-111599326198 and convocatory 528, scholarships for PhD students).

+ Corresponding author: rhyoslopez@gmail.com

Received 11 March 2016

Accepted 19 July 2016

MATERIALS AND METHODS

Study area and mosquito samples - Mosquitoes were collected at eight sites in a rural area called “La Balsa” (9° 21' 30.97" N, 75° 58' 37.28" W) in San Bernardo del Viento (Fig. 1). San Bernardo del Viento (approximate population: 32,000) is two meters above sea level, has a mean annual temperature of 30°C and is bordered by the Sinú River delta. The study area consisted of numerous mangrove trees (across 74 ha), such as “Mangle rojo” (*Rhizophora mangle*), “Mangle bobo” (*Laguncularia racemosa*), “Zaragoza” (*Conocarpus erectus*), “Mangle negro” (*Avicennia germinans*), and “Mangle piñuelo” (*Pelliciera rhizophorae*), with a canopy averaging 24 m in height (Rojas & Sierra-Correa 2010). The ground is well irrigated by streams transecting the study site that eventually form ponds and ditches. Small rice fields cultivated by local residents near their homes and inside the mangrove habitats were also inspected. Cattle, chickens, goats, horses, and donkeys were the most common peridomestic animals observed in farm areas close (within approximately 400 m) to the mangroves. Mosquitoes, namely resting and engorged females, were manually sampled.

Adult mosquitoes were collected on seven field trips between September 2011 and October 2013, during seasons (February-April, September-November) of peak bird migration. Each field trip consisted of five to seven days of sampling. Mosquitoes were collected using eight dry ice-baited CDC light traps operated for a 14 h period from 5:00 p.m. to 7:00 a.m. The light traps were placed

in the mangrove forest, in small rice fields inside this forest, at the edge of mangroves, in secondary forests, and in peridomestic sites (Fig. 2). Additionally, manual and electric aspirators were used during the day (9:00 a.m.-4:00 p.m.) to collect mosquitoes in their resting sites.

After each collection, mosquitoes were sorted and pooled in the field using a cold table. Mosquitoes were pooled based on similar external morphological characteristics. Samples were stored in cryovials containing 1-50 specimens, placed in a liquid nitrogen tank, and transported to the insectary (Universidad Nacional de Colombia, Medellín). A reference mosquito collection that includes morphospecies identified during the field trips was established. Mosquitoes were mounted and identified using morphological keys (Lane & Cerqueira 1942, Lane 1953, Cova-Garcia 1966, Bram 1967, Arnell 1973, Berlin & Belkin 1980, Sirivanakarn 1982, Clark-Gil & Darsie Jr 1983, Pecor et al. 1992, Forattini 2002a, González & Carrejo 2007). In addition, a barcoding methodology was used to identify mosquitoes (Kumar et al 2007, Hoyos-López et al. 2015a, b, c, d). Protocols were implemented as described in the International Barcode of Life (iBOL) project (<http://www.ibol.org/>).

Arbovirus detection by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequencing - Each mosquito pool tested for viruses was triturated in a cold mortar with sterile minimum essential medium (MEM) supplemented with 10% foetal bovine serum and 1% penicillin and then clarified by centrifugation at 13000

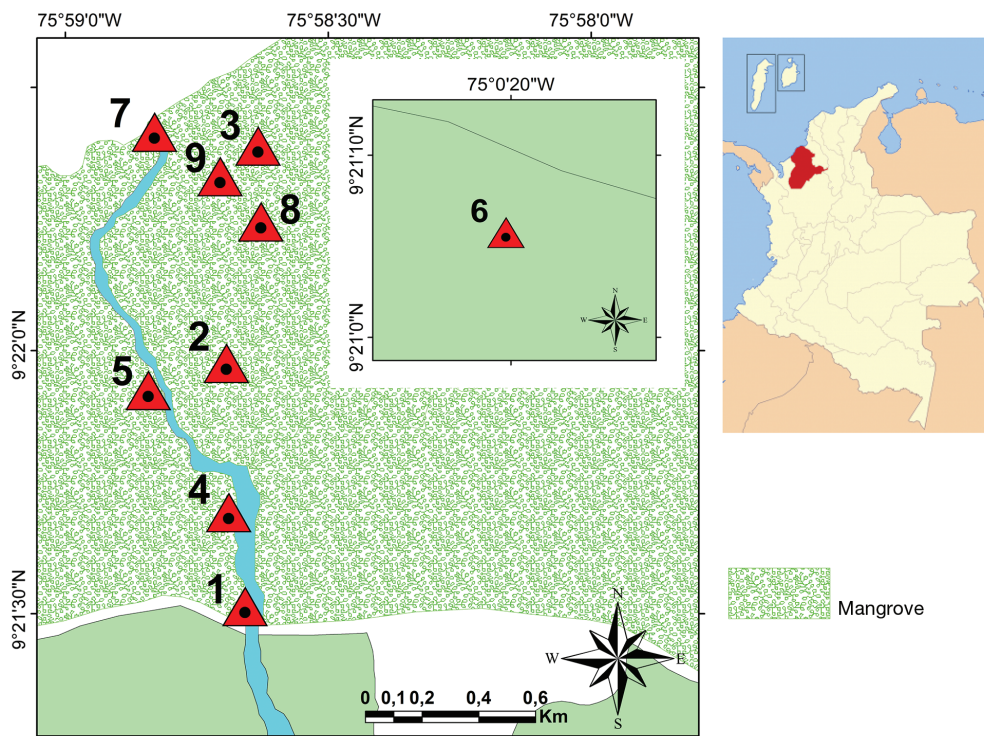


Fig. 1: map of the study area in San Bernardo del Viento (Córdoba). Precise sampling locations: (1) human domiciles in “La Balsa”; (4) pastures; (2) rice fields in mangrove forest; (3), (5), (7), (9), (8) mangrove forests; (6) secondary forest. The distance between the secondary forest and the rural zone “La Balsa” is 7.36 km.



Fig. 2: ecosystems sampled in San Bernardo del Viento (Córdoba). (A-B) Mangrove forest; (C) rice fields in mangrove forest; (D) pastures; (E) secondary forest; (F) houses around mangroves (approximately 500 m).

rpm for 30 min. The supernatant was poured into Eppendorf tubes, and total RNA was extracted using an RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Generic (RT-PCR) and nested (RT-nested PCR) were performed using a One-Step RT-PCR kit (Qiagen, Valencia). The protocols used for flavivirus and alphavirus detection were those described by Sánchez-Seco et al. (2001, 2005) (Supplementary data, Table). The viruses used as positive controls were DENV (New Guinea strain) and VEEV (Argentina strain) donated by Dr Luis Adrián Díaz (Universidad Nacional de Córdoba). Positive samples were sequenced in both directions using an ABI automatic sequencer (Macrogen, Korea), and the resulting sequences were compared with GenBank reference sequences.

Sequence and data analyses - Nucleotide sequences of positive samples were compared with those of reference strains from each viral group (Sánchez-Seco et al. 2001, 2005). Sequences obtained from the first product amplified by RT-PCR (Sánchez-Seco et al. 2005) were aligned using Bioedit v7.0 (Hall 1999). The neighbour-joining algorithm (Saitou & Nei 1987) and Kimura 2-parameter model (Nei & Kumar 2000) were used to construct a dendrogram in MEGA v6.0 software (Tamura et al. 2013). Sequences were compared with those available from GenBank using BLASTN (Altschul et al.

1997). Minimum infection rates (MIRs) were calculated as follows: $MIR = \frac{\text{number of positive pools by morphospecies}}{\text{total number of morphospecies tested from that site}} \times 1000$ (Walter et al. 1980).

Ethics - Mosquitoes were collected according to the guidelines of Colombian decree number 1376 (2013), which regulates the collection of wild specimens of biological diversity for non-commercial research. No specific permits were required for this study.

RESULTS

A total of 2102 pools, representing 14 morphospecies, were screened. Mosquitoes were identified based on morphology and DNA barcoding. A total of 268 voucher specimens of mosquito species were deposited in the Francisco Luis Gallego Entomological Museum.

Sequences from alphaviruses and flaviviruses were amplified from 30 of the 2102 mosquito pools (1.43%) (Table). Mosquitoes belonging to the genus *Culex* according to morphology were collected most frequently. *Deinocerites* (*De. atlanticus* aff.), which were present in mangrove forests with numerous crab holes, were also common.

DNA barcodes were obtained for mosquitoes in the genus *Culex*; however, closely related species within the subgenera *Culex* and *Melanoconion* could not be distin-

TABLE
Morphospecies, pools tested, viruses detected, and minimum infection rates (MIRs) by mosquito species

Mosquito species	Mosquito tested	Pools tested	Arboviruses identified in positive pools	MIR*
<i>Culex</i> spp.	10011	816	VEEV (8)	0.799
			SLEV (1)	0.099
			WNV (2)	0.199
			CxFv (2)	0.199
<i>Deinocerites atlanticus</i> aff.	6015	582	VEEV (2)	0.332
<i>Mansonia titillans</i>	1887	259	VEEV (3)	1.59
			SLEV (1)	0.529
<i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i>	1150	107	DENV2 (4)	3.47
<i>Culex (Culex) quinquefasciatus</i>	1019	99	CxFv (4)	3.92
<i>Haemagogus</i> sp. (Splendens section)	757	78	YFV (1)	1.32
<i>Psorophora (Grabhamia) confinnis</i>	622	71	VEEV (1)	1.61
<i>Aedes scapularis</i>	512	62	VEEV (1)	1.95
<i>Aedeomyia squamipennis</i>	83	11	-	-
<i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	72	9	-	-
<i>Anopheles aquasalis</i>	35	5	-	-
<i>Anopheles neomaculipalpus</i>	17	3	-	-
Total	22180	2102	6 (30)	-

*: MIR per 1000 mosquitoes. VEEV (Venezuelan equine encephalitis virus); SLEV (St. Louis encephalitis virus); WNV (West Nile virus); CxFV (*Culex flavivirus*); YFV (yellow fever virus); and DENV (dengue virus).

guished by their sequences, and an exact species could not be assigned to specimens other than *Cx. (Culex) quinquefasciatus* (KT766432–KT766453).

Nested RT-PCR was used to identify viruses in mosquito pools. However, generic RT-PCR with primers targeting flaviviruses (1.1 kb, NS5 gene) and alphaviruses (500 b, nsP4 gene) were also obtained and sequenced, for consensus alignments of 515 and 420 nt, respectively. These sequences were used for identification by BLASTN search and neighbour-joining dendrograms.

The alphaviruses detected in pools of *Culex* spp., *De. atlanticus* aff., *Mansonia titillans*, *Psorophora confinnis*, and *Aedes scapularis* were all identified by their sequences as VEEV (GenBank accession numbers KM031058–KM031073) (Fig. 3). The flaviviruses were identified as DENV serotype 2 (DENV2) (*Ae. aegypti*), YFV (*Haemagogus splendens*), SLEV (*Ma. titillans*, *Culex* spp.), WNV (*Culex* spp.), and CxFV (*Culex* spp., *Cx. quinquefasciatus*) (Fig. 4) (GenBank accession numbers KM031074–KM031087). CxFV was the most commonly detected flavivirus (GenBank accession numbers KM031073–KM031078).

The MIR of SLEV, YFV, and WNV calculated for each morphospecies was low; the notable exceptions were CxFV in *Cx. quinquefasciatus* and DENV2 in *Ae. aegypti*. VEEV was detected in several mosquito species (Table).

VEEV was mostly detected in mosquitoes collected in mangrove forests or in neighbouring ecosystems (mangrove edge, 11 pools; rice crops in mangrove forest, six pools; and mangrove forest, five pools). SLEV, WNV,

and YFV were detected only in mangroves. DENV2 was present in peridomestic sites, and CxFV was only detected in secondary forests.

DISCUSSION

The presence of five arboviruses (genera *Alphavirus* and *Flavivirus*) indicates the risk for emergence or re-emergence of these pathogens in San Bernardo del Viento.

The only alphavirus detected was VEEV, which was found in *Culex* spp., *Ps. confinnis*, *De. atlanticus* aff., *Ae. scapularis*, and *Ma. titillans* specimens. The frequency of VEEV detection and the number of mosquito morphospecies found infected with the virus may facilitate its transmission to reservoirs and possibly to humans (Ferro et al. 2003, 2015, Weaver et al. 2004). In Colombia, VEEV epidemics have been documented in various regions (Soriano-Lleras & Figueroa 1942, Sanmartin-Barbieri & Osorno-Mesa 1954, SanMartín et al. 1971, Rivas et al. 1995, Ferro et al. 2008, 2015), with the following mosquito species implicated in transmission: *Ma. venezuelensis*, *Ae. serratus*, *Aedes (Ochlerotatus) spp.*, *Ae. fulvus*, and *Culex (Melanoconion) spp.* (Groot 1996, Weaver et al. 2004).

Many VEEV isolates have been obtained previously from the Magdalena valley (Ferro et al. 2003) and Norte de Santander (Ferro et al. 2008). In addition, *Culex (Melanoconion) spp.* infected with VEEV have been found in other localities in Colombia, such as Rionegro, Puerto Boyacá, and presumably Lozania, Tolima; *Cx. (Melanoconion) aikenii* (syn. *Cx. (Melanoconion) ocosa*

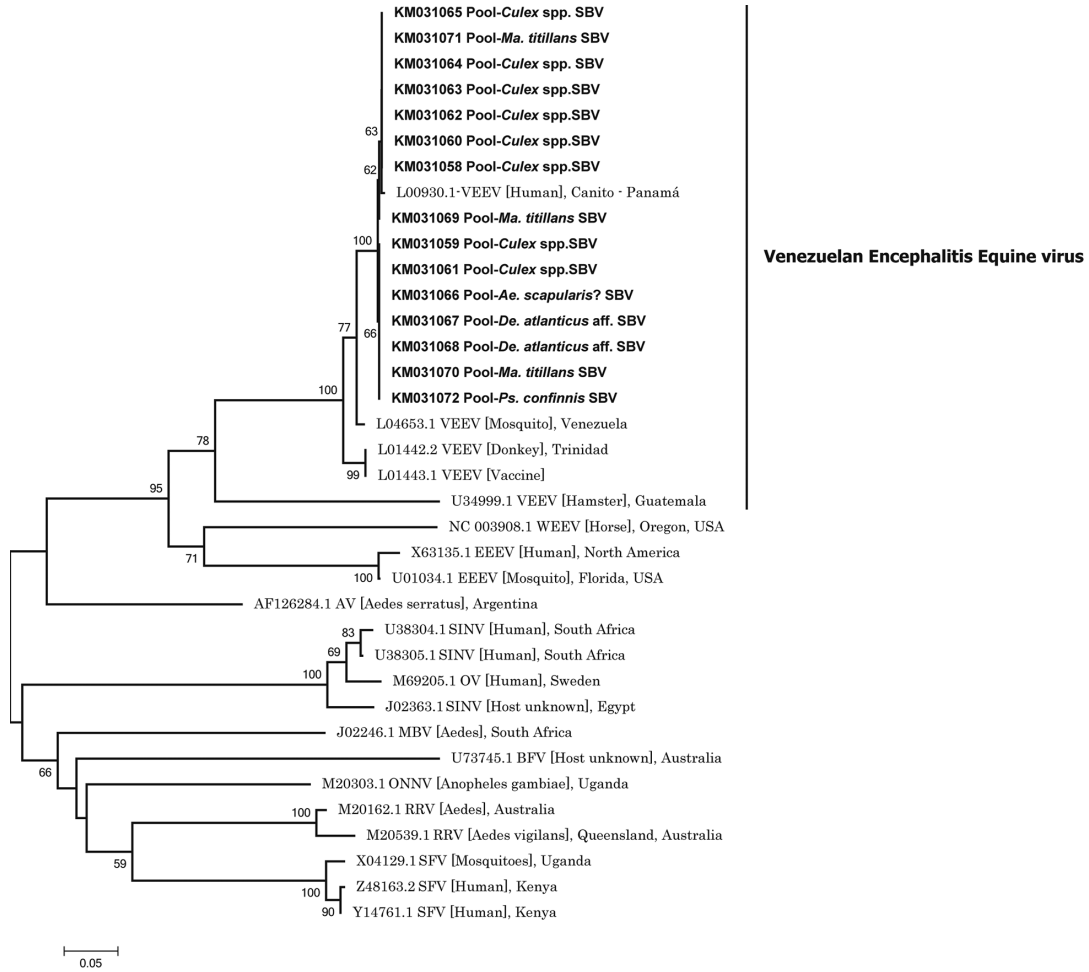


Fig. 3: neighbour-joining analysis used to identify *Alphavirus* sequences detected in mosquitoes (420 nt, nSP4). A dendrogram was constructed using representative sequences from the *Alphavirus* genus available in GenBank. The sequences detected were similar to representative Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) sequences. Abbreviations: WEEV (Western equine encephalitis virus); EEEV (Eastern equine encephalitis virus); AV (Aura virus); SINV (Sindbis virus); OV (Ockelbo virus); BFV (Barmah Forest virus); MBV (Middelburg virus); ONNV (o'nyong nyong virus); RRV (Ross River virus); and SFV (Semliki Forest virus). GenBank accession numbers are followed by the abbreviated names of viruses. The sequences of arboviruses detected in this study are presented with a GenBank accession number, followed by the mosquito species in which they were detected (in bold). SBV: San Bernardo del Viento, Córdoba (Colombia).

and *Cx. (Melanoconion) panocossa*) were determined to be responsible for an epidemic of VEEV in 1973 (Groot 1964). Other species that have been reported as VEEV infected include *Cx. (Melanoconion) vomerifer*, *Cx. (Melanoconion) pedroi*, and *Cx. (Melanoconion) adamesi* in the Monte San Miguel forest in the middle Magdalena valley (Ferro et al. 2008). Most strains of VEEV isolated from the *Culex* subgenus *Melanoconion* in Colombia have been categorized as enzootic subtype ID (Weaver et al. 1996, 2004). Our sequences grouped with VEEV subtype ID strain 3880, which was isolated from a human case in Canito, Panama (Brault et al. 2002). Parra-Henao and Suárez (2012) reported the presence of some *Melanoconion* species, including *Cx. (Mel.) erraticus*, *Cx. (Mel.) pedroi*, and *Cx. (Mel.) tainiopus*, that were the first mosquito species identified by both, morphology and DNA barcoding, in an area adjacent to San Bernardo del Viento (Hoyos-López et al. 2015a, b). However, Cytochrome Oxidase I or DNA-bar-

code fragment - COI sequences from specimens of the *Culex* subgenera *Melanoconion* and *Culex* did not allow molecular differentiation between these species, similar to that reported for species *Cx. coronator* in the subgenus *Culex* in Colombia (Roza-Lopez & Mengual 2015, Hoyos-López et al. 2015d), *Cx. tarsalis* and *Cx. coronator* in Brazil and Argentina (Laurito et al. 2013), and *Cx. salinarius* in Brazil (Demari-Silva et al. 2011).

In our study, *Culex* spp., *Ps. confinnis*, *Ae. scapularis*, and *Ma. titillans* were found to be infected with VEEV. These species are likely enzootic vectors of the virus, as has been reported in various geographic regions of Colombia and in nearby countries (Groot 1964, Hastriter & Lawyer 1998); however, the local vector status of these four species is unknown. Our study is the first report of a natural VEEV infection in *De. atlanticus* aff. This morphospecies was associated with crab holes in mangroves forests that are near the beach and in coconut groves. The adults of this species are reported to have nocturnal

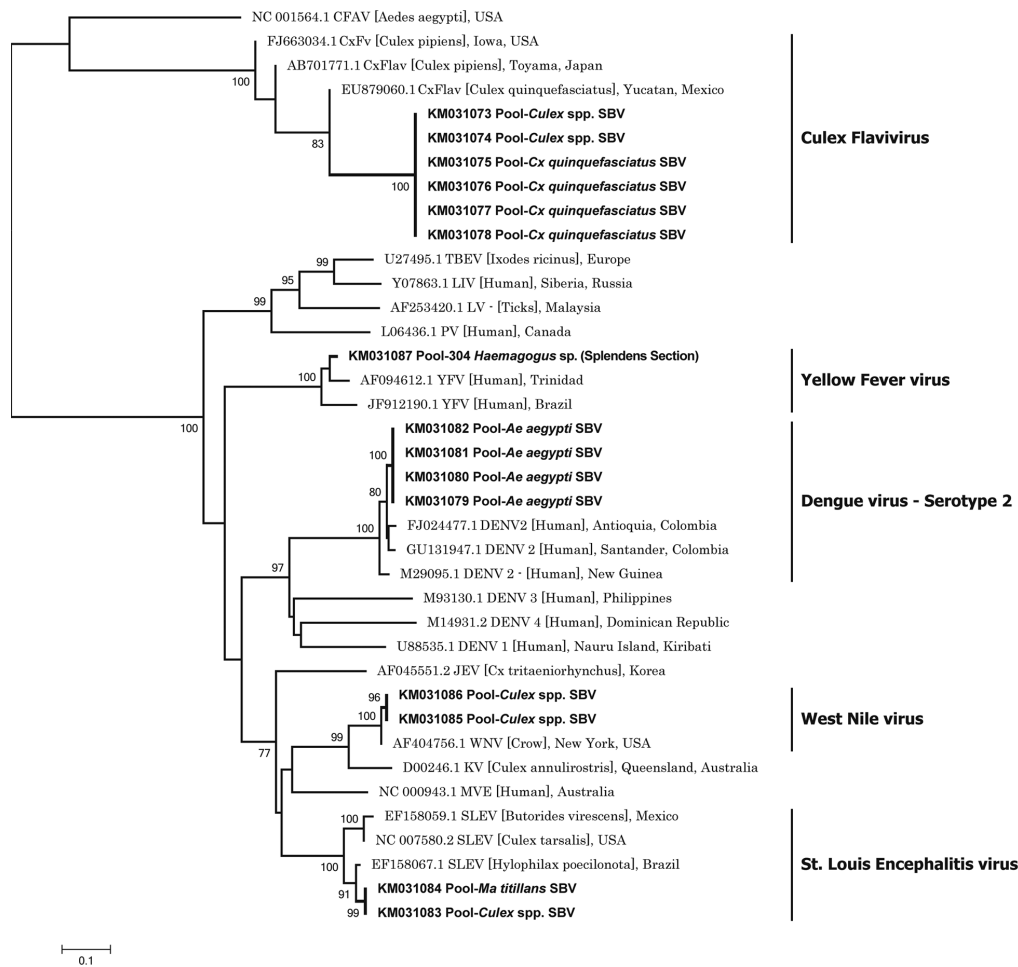


Fig. 4: neighbour-joining analysis used to identify *Flavivirus* sequences detected in mosquitoes (515 nt, NS5). A dendrogram was constructed using representative sequences of the *Flavivirus* genus available in GenBank. The sequences detected were similar representative sequences of dengue virus serotype 2 (DENV2), yellow fever virus (YFV), West Nile virus (WNV), St. Louis encephalitis virus (SLEV), and *Culex flavivirus* (CxFV). Abbreviations: PV (Powassan virus); LV (Langat virus); LIV (louping ill virus); TBEV (tick-borne encephalitis virus); KV (Kunjin virus); MVE (Murray Valley virus); JEV (Japanese encephalitis virus); CFAV (cell fusing agent virus). GenBank accession numbers are followed by the abbreviated names of viruses. The sequences of arboviruses detected in this study are presented with a GenBank accession number, followed by the mosquito species in which they were detected (in bold). SBV: San Bernardo del Viento, Córdoba (Colombia).

or crepuscular habits, resting by day in the upper parts of crab holes (Belkin & Hogue 1959). Their biting activity may extend to humans (Adames 1971). However, many essential aspects of *De. atlanticus* aff. biology remain unknown. In the Guajira department, *De. atlanticus* aff. is the dominant mosquito species. It has been collected inside houses and is a vector of VEEV in this geographic area (Ferro et al. 2015).

SLEV and WNV are emerging flaviviruses that have been detected previously in humans, equines, and birds in the Colombian Caribbean region (Mattar et al. 2005a, b, 2011, Goéz-Rivillas et al. 2010, Osorio et al. 2012). Both viruses detected in this study were molecularly characterised based on the NS5 and envelope genes and were found to be closely related to genotypes associated with attenuated virulence (WNV Texas genotype) (Hoyos-López et al. 2015a) and little activity in human populations (SLEV genotype IV) (Hoyos-López et al. 2015b).

The CxFV detected in this study in pools of *Cx. quin-*

quefasciatus is the first evidence of this virus in Colombia, although it has been reported in the same species in other countries (Hoshino et al. 2007, Morales-Betoulle et al. 2008, Cook et al. 2009, Farfan-Ale et al. 2009, Kim et al. 2009, Huanyu et al. 2012, Machado et al. 2012). A strong ecological association between CxFV and WNV was observed in Chicago, USA (Newman et al. 2011), suggesting that super-infection with WNV during CxFV infection may interfere with secondary viral infection with a similar virus (Farfan-Ale et al. 2009). However, experimental infections of *Cx. quinquefasciatus* with WNV strain Guatemala and CxFV strain Izabal do not support this hypothesis, because prior infection with CxFV had no significant impact on WNV replication, infection, dissemination, or transmission by this mosquito (Kent et al. 2010). It is possible that natural infection with CxFV affects the vector competence of *Cx. quinquefasciatus* through vertical transmission and persistence in mosquito progeny (Bolling et al. 2012), in-

fluencing the ecology of viruses such as WNV and SLEV and even enhancing WNV transmission (Kent et al. 2010). Interestingly, *Cx. quinquefasciatus* was collected only in secondary forests and was absent from peridomestic areas. Possible explanations include the low density (approximately 30) of human households close to mangroves, saline water, and availability of few breeding sites (Forattini et al. 2002b, Correia et al. 2012). Potential breeding sites (many ponds and livestock watering devices) were found near the forest collection site.

In Colombia, vectors that participate in sylvatic YFV transmission include *Haemagogus equinus* and *Haemagogus janthinomys* (Morales 1968). Natural infection of *Haemagogus* sp. (Splendens section) with YFV may suggest an epidemiological risk for humans working in mangroves, as this species readily bites humans and is present in high densities in coastal mangrove forests (Arnell 1973). There have been previous reports of experimental and natural infection of YFV (Galindo et al. 1956, de Rodaniche et al. 1957) and SLEV in *Haemagogus* from Panamá (Kramer & Chandler 2001). In San Bernardo del Viento, cases of yellow fever have not been recorded; however, they are reported annually in the Caribbean region of the Cesar, Guajira, and Magdalena departments (Rojas-Álvarez 2008).

DENV2, and predominantly the American/Asian genotype (subtype IIIb), is frequently detected in patients in Colombia (Méndez et al. 2012). Although there are few cases in San Bernardo del Viento, with approximately 4-6 patients reported between 2011 and 2014 (Secretaría de Salud Municipal, San Bernardo del Viento, personal communication), asymptomatic human cases and clinical underreporting is likely common in other regions of Colombia (Méndez et al. 2006).

We report the first detection of flaviviruses and alphaviruses circulating in coastal mangroves and neighbouring ecosystems in Colombia, indicating a potential health risk to humans living or working in these zones. Interestingly, in the present study, the mangrove edge harboured the most positive pools of VEEV. Some authors have suggested an important role for the transitional zone between two adjacent ecological systems (e.g., mangroves and pastures) or “ecotones” in the transmission of emerging viruses and arboviruses (Estrada-Franco et al. 2004, Despommier et al. 2006). Mosquitoes that vector several viruses (i.e., Rift Valley fever, VEEV, YFV) have been found to be abundant in ecotones (O’Ival & Daszak 2005, Despommier et al. 2006), and they may have the potential to adapt and exploit new breeding sites in human-dominated ecosystems (Diallo et al. 2012). The presence of *Culex* subgenera *Melanoconion* and *Culex* may be important to the emergence and/or re-emergence of WNV, SLEV, and VEEV. Mangrove ecosystems, may be specifically acting as a source of emerging pathogens that infect nearby human populations (Holmes 2008). Furthermore, ecotones have been identified as potentially important for host seeking and host switching (Burg 2001, Méndez et al. 2001, Hoberg et al. 2002). Because of the high concentrations of reservoirs and potential hosts, jumps to alternative hosts or mosquitoes with different levels of vector competence may be favoured (Barrera et al. 2002, Deardoff et al.

2011). A key factor is that RNA arboviruses have high rates of evolution that may facilitate the generation of progeny with variable fitness or virulence in alternative hosts (Holmes 2008, 2009, Hoyos et al. 2012).

All of these ecological and evolutionary factors may play a role in niche changes and consequent “jumps” of new pathogens to humans (Weaver 2005, Despommier et al. 2006, Holmes 2008, 2009, Hoyos et al. 2012). Therefore, it will be important to further study some aspects of arbovirus ecology in San Bernardo del Viento, such as the diversity of possible reservoirs, including migrant/resident birds, rodents, opossums, and bats. The wildlife commonly associated with mangrove forests around “La Balsa” include 296 species of birds (belonging to 61 families, of which 64 species are migratory) (Estela et al. 2005, 2010, Arzuza et al. 2008, Ruiz-Guerra et al. 2008), reptiles (Rojas & Sierra-Correa 2010), and mammals such as rodents (*Oligoryzomys* spp. and *Zygodontomys* spp.), bats (*Artibeus* spp., *Carollia* spp., and *Sturnira* spp.), sloths (*Bradypus* spp.), opossums (*Didelphis marsupialis*) (unpublished data), and primates (*Aotus lemurinus*, *Ateles geoffroyi*, *Cebus albifrons*, and *Saguinus oedipus*) (Rojas & Sierra-Correa 2010). Other factors such as the spatial distributions of potential reservoirs, arboviruses present in these communities, and evolutionary variants (e.g., low virulence) of detected arboviruses may explain the absence of encephalitis/haemorrhagic fever cases in humans (Mattar et al. 2005b, Weaver 2005, Hoyos-López et al. 2015a, b).

Arbovirus detection is just one aspect of vector incrimination, and more data are needed to identify potential vectors, define vector competence, and identify specific habitats, biting behaviour, and blood feeding patterns of possible vectors. All of these aspects should be considered in a context of global climate change, which is another factor that may contribute to the emergence of new diseases (Naicker 2011, Butler 2012) and may be particularly important in Colombia, which experiences the effects of climatological oscillations such as ENSO (Poveda et al. 2001, Singh 2013). These abiotic changes may contribute to an increase in the size of mosquito populations and in cases of vector borne diseases (Poveda et al. 2000). These perspectives may contribute to the development of more effective disease prevention and control strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Luis Adrián Díaz, of the Universidad Nacional de Córdoba (Córdoba, Argentina), for his collaboration in the methodological design and advice for exploratory field trips, Diego León Arias, Diego Carrero Sarmiento, Maria Angelica Contreras and undergraduate students Diego Puerta and David Gallo, for their assistance in entomological collections.

REFERENCES

- Adames A. A revision of the crabhole mosquitoes of the genus *Deinocerites*. Contrib Am Entomol Inst. 1971; 7(2): 1-158.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997; 25(17): 3389-3402.

- Álvarez J, González M, Mattar S. Actividad del virus del oeste del Nilo y otros flavivirus en cinco departamentos del Caribe colombiano. *Rev MVZ Córdoba*. 2010; 15(1): 2021-2.
- Arnell JH. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXII. A revision of the genus *Haemagogus*. *Contrib Amer Entomol Inst*. 1973; 10(2): 1-174.
- Arzuza D, Moreno M, Salaman P. Conservación de las aves acuáticas de Colombia. *Conservación Colombiana*. 2008; 6: 1-72.
- Auguste AJ, Carrington CV, Forrester NL, Popov VL, Guzman H, Widen SG, et al. Characterization of a novel Negevirus and a novel Bunyavirus isolated from *Culex (Culex) declarator* mosquitoes in Trinidad. *J Gen Virol*. 2014; 95(2): 481-5.
- Barajas J, Suaza J, Torres C, Rúa G, Uribe-Soto S, Porter C. Mosquitos (Diptera: Culicidae) asociados a guadua en los municipios de Anserma, Hispania y Jardín, Colombia. *Rev Col Entomol*. 2013; 39(1): 132-40.
- Barrera R, Ferro C, Navarro J, Freier J, Liria J, Salas R, et al. Contrasting sylvatic foci of Venezuelan equine encephalitis virus in northern South America. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(3): 324-34.
- Barrera S, Martínez S, Tique-Salleg V, Miranda J, Guzman C, Mattar S. Seroprevalencia de Hantavirus, Rickettsia y Chikungunya en población indígena del municipio de Tuchín, Córdoba. *Infectio*. 2015; 19(2): 75-82.
- Belkin J, Hogue C. A Review of the crabhole mosquitoes of the genus *Deinocerites* (Diptera, Culicidae). *Univ Calif Pubs Entomol*. 1959; 14(6): 411-58.
- Berlin O, Belkin J. Mosquito studies (Diptera: Culicidae). XXXVI. Subgenera *Aedinus*, *Tinolestes* and *Anodioporpa* of *Culex*. *Contrib Amer Entomol Inst*. 1980; 17(2): 1-104.
- Bolling BG, Olca-Popelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology*. 2012; 427(2): 90-7.
- Bram RA. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the New World (Diptera, Culicidae). *Proceedings of United States Natural History Museum*. 1967; 120(3557): 1-122.
- Brault AC, Powers AM, Holmes EC, Woelk CH, Weaver SC. Positively charged amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein are associated with the emergence of Venezuelan equine encephalitis virus. *J Virol*. 2002; 76(4): 1718-30.
- Burg J. Seasonal activity and spatial distribution of host-seeking adults of the tick *Dermacentor variabilis*. *Med Vet Entomol*. 2001; 15(4): 413-21.
- Butler C. Infectious disease emergence and global change: thinking systemically in a shrinking world. *Infect Dis Poverty*. 2012; 1(1): 5.
- Clark-Gil S, Darsie Jr RF. The mosquitoes of Guatemala. Their identification, distribution and bionomics. *Mosq Syst*. 1983; 15(3): 151-284.
- Cook S, Moureau G, Harbach R, Mukwaya L, Goodger K, Ssenfuka F, et al. Isolation of a novel species of flavivirus and a new strain of *Culex* Flavivirus (Flaviviridae) from a natural mosquito population in Uganda. *J Gen Virol*. 2009; 90(11): 1669-78.
- Correia JC, Barbosa RMR, de Oliveira CMF, de Albuquerque CMR. Residential characteristics aggravating infestation by *Culex quinquefasciatus* in a region of Northeastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 2012; 46(6): 935-41.
- Cova-García P. Mosquitos de Venezuela. Tomo II. Caracas: Ministerio de Sanidad y Asistencia Social; 1966. 66 pp.
- de Rodaniche E, Galindo P, Johnson C. Isolation of yellow fever virus from *Haemagogus lucifer*, *H. equinus*, *H. spegazzinii* falco, *Sabethes chloropterus* and *Anopheles neivai* captured in Panama in the fall of 1956. *Am J Trop Med Hyg*. 1957; 6(4): 681-5.
- Dearhoff E, Estrada-Franco J, Freier J, Navarro-López R, da Rosa A, Tesh R, et al. Candidate vectors and rodent hosts of Venezuelan equine encephalitis virus, Chiapas, 2006-2007. *Am J Trop Med Hyg*. 2011; 85(6): 1146-53.
- Demari-Silva B, Vesqueiro FT, Sallum MA, Marelli MT. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *J Med Entomol*. 2011; 48(2): 272-9.
- Despommier D, Ellis B, Wilcox B. The role of ecotones in emerging infectious diseases. *EcoHealth*. 2006; 3(4): 281-9.
- Diallo D, Diagne CT, Hanley KA, Sall AA, Buenemann M, Ba Y, et al. Larval ecology of mosquitoes in sylvatic arbovirus foci in southeastern Senegal. *Parasit Vectors*. 2012; 5: 286.
- Estela F, López-Victoria M. Aves de la parte baja del Río Sinú, Caribe Colombiano; inventario y ampliaciones de distribución. *Bol Invest Mar Cost*. 2005; 34(1): 7-42.
- Estela F, Ruiz-Guerra C, Solano O, Ortiz-Ruiz J. Aves del estuario del Río Sinú. Cali: Asociación Calidris; 2010. 34 pp.
- Estrada-Franco JG, Navarro-López R, Freier J, Cordova D, Clements T, Moncayo A, et al. Venezuelan equine encephalitis virus, Southern Mexico. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(12): 2113-21.
- Farfan-Ale J, Loroño-Pino M, Garcia-Rejon J, Hovav E, Powers A, Lin M, et al. Detection of RNA from a novel West Nile-like virus in high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80(1): 85-95.
- Ferro C, Boshell J, Moncayo A, González M, Ahumada M, Kang W, Weaver S. Natural enzootic vectors of Venezuelan equine encephalitis virus in the Magdalena Valley, Colombia. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(1): 49-54.
- Ferro C, de las Salas J, González M, Díaz A, Cabrera C, Flórez Z, et al. Do some conditions contribute to the reemergence of the Venezuelan equine encephalitis virus in the Colombian Alta Guajira? *Biomédica*. 2015; 35(1): 62-72.
- Ferro C, Olano V, Ahumada M, Weaver S. Mosquitos (Diptera: Culicidae) en el caserío de Chingalé, Santander, donde se registró un caso humano de encefalitis equina venezolana. *Biomedica*. 2008; 28(2): 234-44.
- Forattini O. *Culicidologia médica: identificação, biologia, epidemiologia*. Vol. II. São Paulo: Universidad de São Paulo; 2002a. 859 pp.
- Forattini OP, Kakitani I, Santos RLC, Kobayashi KM, Ueno HM, Fernandez Z. Potencial sinantrópico de mosquitos *Kertessia* e *Culex* (Diptera: Culicidae) no Sudeste do Brasil. *Rev Saude Publica*. 2002b; 34(6): 565-9.
- Galindo P, de Rodaniche E, Trapido H. Experimental transmission of yellow fever by Central American species of *Haemagogus* and *Sabethes chloropterus*. *Am J Trop Med Hyg*. 1956; 5(6): 1022-31.
- Góez-Rivillas Y, Taborda N, Díaz F, Góngora A, Rodas J, Ruiz-Sáenz J, et al. Antibodies to West Nile virus in equines of Antioquia and Meta, Colombia, 2005-2008. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 2010; 23(4): 462-4.
- González R, Carrejo N. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia. Claves y notas de distribución. Grupo de Investigaciones Entomológicas. Colombia: Universidad del Valle; 2007. 238 pp.
- González-Reiche A, Monzón-Pineda M, Johnson B, Morales-Betoulle M. Detection of West Nile viral RNA from field-collected mosquitoes in tropical regions by conventional and real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2010; 630: 109-24.

- Groot H. Estudios sobre virus transmitidos por artrópodos en Colombia. *Rev Acad Colomb Cienc.* 1964; XII(46): 197-217.
- Groot H. Estudios de arbovirosis en Colombia en la década de 1970. *Biomedica.* 1996; 16(4): 331-44.
- Gubler D. The global threat of emergent/reemergent vector-borne diseases. In: Lemon S, Sparling F, Hamburg M, Relman D, Choffnes E, Mack A, editors. *Vector-borne diseases: understanding the environmental, human health, and ecological connections, workshop summary (Forum on Microbial Threats)*. Washington (DC): National Academy of Sciences/National Academy Press; 2008. p. 43-64.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41: 95-8.
- Hastriter M, Lawyer P. Disease vector ecology profile Colombia. Washington (DC): Armed Forces Pest Management Board; 1998. 80 pp.
- Hoberg E, Kutz S, Nagy J, Jenkins E, Elkin B, Branigan M. *Protostrongylus stilesi* (Nematoda: Protostrongylidae): ecological isolation and putative host-switching between Dallaposis sheep and muskoxen in a contact zone. *Comp Parasitol.* 2002; 69(1): 1-9.
- Holmes E. Evolutionary history and phylogeography of human viruses. *Annu Rev Microbiol.* 2008; 62: 307-28.
- Holmes E. The evolutionary genetics of emerging viruses. *Ann Rev Ecol Evol Syst.* 2009; 40: 353-72.
- Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Yano K, Sasaki T, Yuda M, et al. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology.* 2007; 359(2): 405-14.
- Hoyos R, Usme J, Gallego JC. Viral evolutionary ecology: conceptual basis of a new scientific approach for understanding viral emergence. In: Nuno L, editor. *Epidemiology - Current perspectives on research and practice*. Rijeka: Intech; 2012. p. 119-27.
- Hoyos-López R, Roman SR, Castaño JC, Gallego-Gómez JC. DNA barcode for typing of immature mosquitoes from Armenia and Circasia (Quindío, Colombia). *Rev Colomb Entomol.* 2015d; 41(2): 218-27.
- Hoyos-López R, Soto SU, Rúa-Uribe G, Gallego-Gómez JC. Molecular identification of Saint Louis encephalitis virus genotype IV in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015b; 110(6): 719-25.
- Hoyos-López R, Suaza J, Tenorio A, Uribe S, Gallego-Gómez J. Molecular detection of eastern equine encephalitis virus in mosquitoes from La Pintada (Antioquia). *Rev MVZ Córdoba.* 2015c; 20(3): 4800-6.
- Hoyos-López R, Uribe S, Gallego-Gómez JC. Evolutionary relationships of West Nile virus detected in mosquitoes from a migratory bird zone of Colombian Caribbean. *Viol J.* 2015a; 12: 80.
- Huanyu W, Haiyan W, Shihong F, Guifang L, Hong L, Xiaoyan G, et al. Isolation and identification of a distinct strain of *Culex* Flavivirus from mosquitoes collected in Mainland, China. *Viol J.* 2012; 9: 73.
- Jaramillo M, Peña J, Berrocal L, Komar N, González M, Ponce C, et al. Vigilancia centinela para el virus del Oeste del Nilo en culicidos y aves domésticas en el departamento de Córdoba. *Rev MVZ Córdoba.* 2005; 10(2): 633-8.
- Kent R, Crabtree M, Miller B. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex* Flavivirus Izabal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(5): e671.
- Kim D, Guzman H, Bueno R, Dennett J, Auguste A, Carrington C, et al. Characterization of *Culex* Flavivirus (Flaviviridae) strains isolated from mosquitoes in the United States and Trinidad. *Virology.* 2009; 386(1): 154-9.
- Kramer L, Chandler L. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. *Arch Virol.* 2001; 146(12): 2341-55.
- Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2007; 44(1): 1-7.
- Lane J, Cerqueira N. Os sabetíneos da America (Diptera: Culicidae). *Arq Zool.* 1942; 3: 473-82.
- Lane J. Neotropical Culicidae. Vols I-II. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1953. 1112 pp.
- Laurito M, de Oliveira TMP, Almirón WR, Sallum MAM. COI barcode versus morphological identification of *Culex* (*Culex*) (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013; 108(Suppl. 1): 110-22.
- Machado D, Mondini A, dos Santos S, Santana V, Yonamine P, Chiaravalloti F, et al. First identification of *Culex* flavivirus (Flaviviridae) in Brazil. *Intervirology.* 2012; 55(6): 475-83.
- Mattar S, Edwards E, Laguado J, González M, Alvarez J, Komar N. West Nile virus antibodies in Colombian horses. *Emerg Infect Dis.* 2005a; 11(9): 149-50.
- Mattar S, Komar N, Young G, Alvarez J, Gonzalez M. Seroconversion for West Nile and St. Louis encephalitis viruses among sentinel horses in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(8): 976-9.
- Mattar S, Parra M, Torres J. Limitaciones para el serodiagnóstico del virus del Nilo del oeste en zonas endémicas con co-circulación de Flavivirus en el Caribe colombiano. *Colomb Med.* 2005b; 36(3): 179-85.
- Méndez F, Barreto M, Arias J, Rengifo J, Muñoz J, Burbano M, et al. Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74(4): 678-83.
- Méndez J, Gerzaín R, Bernal M, Calvache D, Boshell J. Detección molecular del virus de la fiebre amarilla en muestras de suero de casos fatales humanos y en cerebros de ratón. *Biomedica.* 2003; 23(2): 232-8.
- Méndez J, Usme-Ciro J, Domingo C, Rey G, Sánchez J, Tenorio A, et al. Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Viol J.* 2012; 9: 64.
- Méndez W, Liria J, Navarro J, García C, Freier J, Salas R, et al. Spatial dispersion of adult mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a sylvatic focus of Venezuelan equine encephalitis virus. *J Med Entomol.* 2001; 38(6): 813-21.
- Morales A. Distribución geográfica, horizontal y vertical de *Haemagogus* (Diptera: Culicidae) de Colombia. *Rev Acad Cien Fls Exact Nat.* 1968; 13: 267-72.
- Morales-Betoulle M, Monzón M, Sosa S, Panella N, López M, Córdón-Rosales C, et al. *Culex* flavivirus isolates from mosquitoes in Guatemala. *J Med Entomol.* 2008; 45(6): 1187-90.
- Múnera G, Méndez J, Rey G. Importancia de los análisis serológicos, moleculares y virológicos en la vigilancia de la fiebre amarilla en Colombia, 2006-2008. *Biomedica.* 2010; 30(3): 345-52.
- Naicker P. The impact of climate change and other factors on zoonotic diseases. *Arch Clin Microbiol.* 2011; 2(4): 1-6.
- Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000. 800 pp.
- Newman C, Cerutti F, Anderson T, Hamer G, Walker E, Kitron U, et al. *Culex* flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(8): 1099-105.
- Nunes M, Silva S, Carvalho V, Vasconcelos J, da Silva D, Oliveira L, et al. Emergence of a new insect-restrictive viruses in the Amazon Region. *Genome Announc.* 2015; 3(2): e00131-5.

- Olival KJ, Daszak P. The ecology of emerging neurotropic viruses. *J Neurovirol.* 2005; 11(5): 441-6.
- Osorio J, Ciuderis K, Lopera J, Piedrahita L, Murphy D, Levasseur J, et al. Characterization of West Nile viruses isolated from captive American flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87(3): 565-72.
- Parra-Henao G, Suárez L. Mosquitos (Diptera: Culicidae) vectores potenciales de arbovirus en la región de Urabá, noroccidente de Colombia. *Biomedica.* 2012; 32(2): 252-62.
- Pecor JE, Mallampalli VL, Harbach RE, Peyton EL. Catalog and illustrated review of the subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Contrib Am Entomol Inst.* 1992; 27(2): 1-228.
- Poveda G, Graham N, Epstein P, Rojas W, Quiñones M, Velez I. Climate and ENSO variability associated with vector-borne diseases in Colombia. In: Diaz H, Markgraf V, editors. *El Niño and the southern oscillation multiscale variability and global and regional impacts.* New York: Cambridge University Press; 2000. p. 183-204.
- Poveda G, Jaramillo A, Gil M, Quiceno N, Mantilla R. Seasonality in ENSO-related precipitation, river discharges, soil moisture, and vegetation index in Colombia. *Water Resour Res.* 2001; 37(8): 2169-78.
- Prías-Landínez E, Bernal C, Morales A. Isolation of Ilheus virus from man in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1968; 17(1): 112-4.
- Rivas F, Díaz A, Cardenas M, Daza E, Bruzon L, Alcalá A, et al. Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. *J infect Dis.* 1995; 175(4): 828-32.
- Roca-García M. Isolation of three neurotropic viruses from forest mosquitoes in eastern Colombia. *J Infect Dis.* 1944; 75(2): 160-9.
- Rojas X, Sierra-Correa P, editors. Plan integral de Manejo del Distrito de Manejo Integrado (DMI) bahía de Cispatá - La Balsa - Tinajones y sectores aledaños del delta estuarino del río Sinú, departamento de Córdoba. Santa Marta, Magdalena (Colombia): Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge (CVS) e Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR); 2010. 76 pp.
- Rojas-Álvarez D. Situación de la fiebre amarilla en Colombia. Informe final de 2007. *Inf Quinc Epidemiol Nal.* 2008; 13: 97-108.
- Rozo-López P, Mengual X. Mosquito species (Diptera, Culicidae) in three ecosystems from the Colombian Andes: identification through DNA barcoding and adult morphology. *Zookeys.* 2015; 513: 29-64.
- Ruiz-Guerra C, Johnston-González R, Castillo L, Cifuentes-Sarmiento Y, Eusse D, Estela F. Atlas de aves playeras y otras aves acuáticas en la Costa Caribe Colombiana. Cali, Valle del Cauca (Colombia): Asociación Calidris; 2008. 77 pp.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4(4): 406-25.
- Sánchez-Seco M, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán M, et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J Virol Methods.* 2005; 126(1-2): 101-9.
- Sánchez-Seco M, Rosario D, Quiroz E, Guzmán G, Tenorio A. A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the Alphavirus genus. *J Virol Methods.* 2001; 95(1-2): 153-61.
- SanMartín C, Trapido H, Barreto P, Lesmes C. Isolation of Venezuelan and eastern equine encephalomyelitis from sentinel hamsters exposed in pacific lowlands in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1971; 20(3): 469-73.
- Sanmartin-Barbieri C, Osorno-Mesa E. Human epidemic in Colombia caused by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1954; 3(2): 283-91.
- Singh S. *Viral infections and global change.* New Jersey: Blackwell press; 2013. 660 pp.
- Sirivanakarn S. A review of the systematics and proposed scheme of internal classification of the new world subgenus *Melanoconion* of *Culex* (Diptera: Culicidae). *Mosq Syst.* 1982; 14: 265-332.
- Soriano-Lleras A, Figueroa L. Aislamiento de un virus de caballo atacado con "peste loca". *Bol Inst Nac Hig.* 1942; 7: 1-8.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Peterson N, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12): 2725-9.
- Vasilakis N, Forrester NL, Palacios G, Nasar F, Savji N, Rossi SL, et al. Negevirus: a proposed new taxon of insect-specific viruses with wide geographic distribution. *J Virol.* 2013; 87(5): 2475-88.
- Walter S, Hildreth S, Beaty B. Estimation of infection rates in population of organisms using pools of variable size. *Am J Epidemiol.* 1980; 112(1): 124-8.
- Weaver S, Ferro C, Barrera R, Boshell J, Navarro J. Venezuelan equine encephalitis. *Annu Rev Entomol.* 2004; 49: 141-74.
- Weaver S, Reisen W. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010; 85(2): 328-45.
- Weaver S, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig G, Steven M, Boshell J, et al. Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. *Lancet.* 1996; 348(9025): 436-40.
- Weaver SC. Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Arch Virol Suppl.* 2005; 19: 33-44.



HHS Public Access

Author manuscript

Virology. Author manuscript; available in PMC 2018 January 15.

Published in final edited form as:

Virology. 2017 January 15; 501: 166–175. doi:10.1016/j.virol.2016.11.014.

Sinu Virus, a Novel and divergent Orthomyxovirus Related to Members of the Genus *Thogotovirus*, Isolated from Mosquitoes in Colombia

María Angélica Contreras-Gutiérrez^b, Marcio R.T. Nunes^c, Hilda Guzman^d, Sandra Uribe^b, Juan Carlos Gallego Gómez^f, Juan David Suaza Vasco^{a,b}, Jedson F. Cardoso^c, Vsevolod L. Popov^d, Steven G. Widen^g, Thomas G. Wood^g, Nikos Vasilakis^{d,*}, and Robert B. Tesh^{d,*}

^aPrograma de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET - SIU-Sede de Investigación Universitaria – Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^bGrupo de Investigación en Sistemática Molecular-GSM, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Medellín, Colombia

^cCenter for Technological Innovation, Evandro Chagas Institute, Ministry of Health, Ananindeua, Para, Brazil

^dDepartment of Pathology, Institute for Human Infections and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA

^eGrupo de Investigación en Enfermedades Tropicales y Resistencia Bacteriana, Universidad del Sinú, Montería, Córdoba, Colombia

^fGrupo de Investigación en Medicina Molecular y Traslacional– Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^gDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, USA

Abstract

The genome and structural organization of a novel insect-specific orthomyxovirus, designated Sinu virus, is described. Sinu virus (SINUV) was isolated in cultures of C6/36 cells from a pool of mosquitoes collected in northwestern Colombia. The virus has six negative-sense ssRNA segments. Genetic analysis of each segment demonstrated the presence of six distinct ORFs encoding the following genes: PB2 (Segment 1), PB1, (Segment 2), PA protein (Segment 3), envelope GP gene (Segment 4), the NP (Segment 5), and M-like gene (Segment 6).

Phylogenetically, SINUV appears to be most closely related to viruses in the genus *Thogotovirus*.

*Corresponding author at: Robert B. Tesh Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard Galveston, TX 77555-0609 Phone: 409.747.2431; Fax: 409.747.2429. *Corresponding author at: Nikos Vasilakis, Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard Galveston, TX 77555-0609 Phone: 1 409 772 3938. Fax: 409.747.2429.

Publisher's Disclaimer: This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Keywords

Sinu virus; *Orthomyxoviridae*; *Thogotovirus* genus; Insect-specific viruses

INTRODUCTION

Arthropod-borne viruses (arboviruses) are viruses infecting vertebrates that are biologically transmitted by hematophagous arthropods in an alternative vertebrate-arthropod cycle (Bolling et al., 2015). Arboviruses replicate in both their vertebrate and arthropod hosts; and some are capable of causing major diseases outbreaks, such as dengue, yellow fever, Japanese encephalitis, Rift Valley fever and bluetongue, affecting both human and domestic animal populations.

During the past two decades with the advent of sequencing and metagenomics, a second group of viruses has been discovered in hematophagous insects that are now generally referred to as “insect-specific viruses” (ISVs) (Bolling et al. 2015, Blitvich and Firth, 2015, Junglen and Drosten, 2013). Although many of the ISVs are genetically related to some of the important vertebrate pathogenic arboviruses, they differ biologically from the true arboviruses by their inability to infect vertebrates or to replicate in vertebrate cells (Bolling et al. 2015). They are host-restricted to replication in invertebrate cells.

To date, most of known ISVs have been associated with blood-feeding Diptera (mosquitoes, sandflies and midges) and relatively few have been described in Acari or other types of hematophagous arthropods (Bolling et al. 2015, Blitvich and Firth, 2015).

The purpose of this report is to describe and characterize a novel ISV orthomyxovirus, designated Sinu virus, that was isolated in C6/36 mosquito cells from a pool of adult mosquitoes collected in Cordoba Department on the Caribbean Coast of Colombia in 2013. SINUV appears to be most closely related phylogenetically to the tick-borne viruses in the genus *Thogotovirus*.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study site was located in the municipality of San Bernardo del Viento (9° 21' 30.97" N, 75° 58' 37.28" W), Cordoba department, in northern Colombia on the Caribbean Coast. The area encompasses about 321 Km² (Figure 1) and is classified as lowland dry tropical forest with high mean annual temperature (29°C) and relative humidity of 80%. The region has two contrasting seasons: a dry season from December to April and a rainy season from May until November (Climate-Data.org 2016 <http://en.climate-data.org/location/50073/>). Most of the territory is composed of plateau areas, with approximately 34.2 km of beaches, which are used for ecotourism (Acosta 2013, Rojas et al., 2010). The natural vegetation varies from intervened dry forests to flooded lands, including mangrove swamps and estuaries with halophytic vegetation (CVS, 2004, Serrano 2004).

Mosquito collections

Mosquitoes from San Bernardo were collected, using CDC-light traps, during arbovirus field studies between 2012 and 2013. After collection, mosquitoes were killed by freezing and transported in liquid nitrogen to the University of Antioquia in Medellín, where they were stored at -70°C . The mosquitoes pools were subsequently transported on dry ice to the University of Texas Medical Branch (UTMB) in Galveston for virus assay, following all national and Institutional regulations.

Processing mosquitoes for virus isolation

At UTMB, the mosquitoes were separated into pools of approximately 50 insects that were homogenized in plastic tubes, containing 1.0 mL of phosphate-buffered saline, pH 7.4, with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin-amphotericin stock (Sigma), and a 3 mm stainless steel ball, using a TissueLyser (Quiagen). After centrifugation at 10,000 rpm for 10 mins, 100 μL of each mosquito homogenate was inoculated into a single well of a 24-multiwell tissue culture plate (Corning), containing a monolayer of *Aedes albopictus* C6/36 cells. After absorption for 2 hrs, 1.5 mL of maintenance medium was added to each well and the cultures were incubated for 7–8 days at 28°C . Cultures were examined every 2 days for evidence of viral cytopathic effect (CPE). If CPE was observed, 150 μL of the culture fluid was removed from the well and inoculated into a 12.5 mL flask culture of C6/36 cells to obtain material for study and further characterization, as described below.

Evaluation of CoB 38d (SINUV) growth in mosquito and vertebrate cells

In order to determine the host range of SINUV, a C6/36 cell stock of CoB 38d was inoculated into 12.5 cm^2 flask cultures of the following cell lines, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA.: *Aedes albopictus* clone C6/36 (CRL-1660); baby hamster kidney BHK-21 (CCL-10); African green monkey kidney Vero E6 (CRL-1586) and chicken embryonic fibroblast cells (CRL-12203). Cells were grown in 5 mL of culture medium, recommended in the ATCC specification sheets. C6/36 cells were incubated at 28°C ; Vero, baby hamster and chick embryonic cells were maintained at 37°C . When a confluent monolayer of cells was present in the flasks, 200 μL of stock virus (CoB 38d) was inoculated into each flask. After incubation for 2 hours, the inoculum was aspirated and each flask was washed three times with 5 mL of maintenance medium. After the final wash, 500 μL of the medium was removed as a day 0 sample and was frozen at -80°C for subsequent testing. Cultures were incubated at the temperatures noted above. Each day thereafter, for seven consecutive days, all of the medium was removed by aspiration for testing and 5 mL of fresh medium was added. Total RNA was subsequently extracted from all samples (day 0 to 7), using Trizol (Ambion) reagent and RNeasy Mini Kit (QIAGEN), following instructions of the manufacturer. The viral RNA extracted was assessed by reverse transcription (RT)-PCR assay using SINUV-specific primers targeting the PB1 gene (primer sequences and PCR conditions available upon request).

Transmission electron microscopy

For ultrastructural analysis, infected C6/36 cells were fixed for at least 1hr in a mixture of 2.5% formaldehyde prepared from paraformaldehyde powder and 0.1% glutaraldehyde in

0.05M cacodylate buffer (pH 7.3), to which 0.03% picric acid and 0.03% CaCl₂ were added. The monolayers were washed in 0.1M cacodylate buffer, and cells were scraped off and processed further as a pellet. The pellets were postfixed in 1% OsO₄ in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.3) for 1 h, washed with distilled water, and en bloc stained with 2% aqueous uranyl acetate for 20 min at 60°C. The pellets were dehydrated in ethanol, processed through propylene oxide, and embedded in Poly/Bed 812 (Polysciences, Warrington, PA). Ultrathin sections were cut on a Leica EM UC7 ultramicrotome (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL), stained with lead citrate, and examined in a Philips 201 transmission electron microscope at 60 kV.

Titration of SINUV in mosquito cells

A SINUV stock, prepared in the C6/36 cells, was titrated in 24-well culture plates with monolayers of C6/36 cells. Serial 10-fold dilutions of the virus stock were prepared in phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) with 10% fetal bovine serum (FBS). Then 100µL of each dilution was inoculated into four microplate wells. After absorption at 28°C for 2 hrs, 1.5 mL of maintenance medium was added to each well. Maintenance medium was minimal essential medium (Gibco), supplemented with 2% fetal bovine serum, 2% MEM non-essential amino acid solution (Sigma), 1% NaHCO₃ solution (1.5%) and 1% of a L-glutamine-penicillin-streptomycin 100X solution (Sigma). Microplate cultures were incubated at 28°C in a 5% CO₂ atmosphere. Six days post-infection, mosquito cells from each well were spotted onto Cel-Line 12 well glass slides (Thermo Fisher Scientific) for examination by indirect fluorescent antibody technique (IFAT), as described before (Xiao et al, 2001). A standard IFAT was done, using a mouse hyperimmune polyclonal antibody prepared against Thogoto virus, obtained from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA). The tissue culture infectious dose₅₀ (TCID₅₀) per mL was calculated, using the Reed–Muench method (Reed and Muench, 1938).

RNA extraction, construction of RNA library, sequence assembly and analysis

Viral RNA was extracted from culture fluid of C6/36 cells infected with isolate CoB 38d (SINUV) using Qiaamp RNA mini kit (Qiagen) as previously described by (Vasilakis et al., 2014). The genome sequence of CoB 38d was obtained using parallel sequencing and an Illumina TruSeq RNA v2 Kit, following the manufacturer's protocol. Briefly, a highly efficient protocol was made including the rRNA removal (Ribo-Zero technology) followed by a rapid, ligation-free cDNA synthesis procedure for preparing directional RNA-seq libraries (ScriptSeq v2 technology) (Pease 2012). The data generated were assembled using a de novo strategy implemented in the Mira Software (Chevreux et al. 2004). The resulting contigs were visually inspected and sequences were annotated using the Geneious v. 9 and deposited in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Table 1).

Genome characterization

The recovered genome for isolate CoB 38d was characterized, based on its genetic traits such as genome size, terminal regions, genome organization, potential Open Reading Frames (ORFs), encoded proteins, potential glycosylation sites, cysteine residues, and conserved motifs, using a set of applications available in the Geneious software v. 9 (Kearse

et al., 2012) and the open source NetGlyc v.1.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Genetic Variability

Nucleotide and deduced amino acid sequences of orthomyxoviruses closely related to the CoB 38d strain were obtained from the GenBank database (Tables 1 and 2). Regions referred to the ORFs were translated into amino acid sequences, using the Genious software V.9 to determinate the best amino acid substitution model by using the ProtTest v3.4 software (Darriba et al., 2011). Alignments were visually checked and identity calculations were performed, using Geneious software v.9, as well as by the Boxplot analysis implemented in the R package v.1.14.4 (Maechler et al., 2016) and T test as previously described (Williamson et al., 1989).

Phylogenetic analysis and signal

Phylogenetic trees of the amino acid alignments were created, using the neighbor-joining method and maximum likelihood phylogenetic reconstructions with the RAxML v 8.1.21 hybrid version (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) (Pfeiffer and Stamatakis, 2010). A bootstrap analysis was performed using 1,000 replicates (reliability value of 95%) and trees were visualized in the FigTree graphic viewer (Rambaut 2008). In addition, Bayesian phylogenetic analysis was performed, using Beast v1.8 (Drummond et al., 2012), under the HKY+3+I model, estimating the evolutionary rate using both a strict and an uncorrelated log-normal relaxed clock model.

The phylogenetic signal of each RNA segment was assessed, using the maximum likelihood method (Guindon and Gascuel, 2003). The initial step in this phylogenetic exploration involved the alignment of genomes. This was followed by the reconstruction the phylogenetic signal determined for each 200 nt window, using the bootscanning sliding window approach implemented in the Simplot software. The phylogenetic signal and number of resolved trees for each of the three quartets were estimated in percentage values (Alcantara et al., 2009, Escoto-Delgadillo et al., 2008).

Reassortment analyses of CoB 38d and other orthomyxoviruses

Because viruses with segmented genomes have the potential for reassortment (Gombold and Raming, 1986), nucleotide sequences for each RNA segment of the CoB 38d isolate were used to investigate potential genome reassortment events with other members of the *Thogotovirus* and *Quaranjavirus* genera, using the Simplot V. 3.5.1 software (Lole et al., 1999). Nucleotide sequence similarities are represented in percentage values. For each segment, values ranging from 80 to 100% indicate reassortment.

Molecular modeling and electrostatic maps of the CoB 38d GP protein

A BLASTP (Altschul et al., 1990) search against the PDB (Berman et al., 2000) database was used to identify suitable templates. Sequence alignments between target and template amino acid sequences were performed with PROMALS3D (Pei et al., 2008). Structural models were constructed, using Modeller 9v16 (Webb and Sali, 2014). A total of 100 models were constructed for each target. The best model, based on DOPE score (Shen and

Sali, 2006), was selected for further evaluation with PROSA (Wiederstein and Sippl, 2007) and Ramachandran plots generated with PROCHECK (Laskowski et al., 1996). Pymol (<http://www.pymol.org>) was used to inspect the 3D structure models, calculate structural alignments and to generate electrostatic maps with APBS plugin (Baker et al., 2001). Geneious v9 was used to inspect sequence alignments.

RESULTS

Virus Isolation and *in vitro* characterization

Virus strain CoB 38d was isolated from a single pool of 50 adult mosquitoes (species not identified) collected in June 2013 in northern Colombia. Based on the locality where the mosquito pool was collected, the virus has been designated Sinu virus (SINUV).

The original homogenate of mosquito pool CoB 38d produced CPE in a culture of C6/36 on the fifth day after inoculation. After passage a second time in C6/36 cells, a filtrate of the culture medium was inoculated into flask cultures of Vero and BHK cells, which were inoculated at 37°C for 14 days. No CPE was observed. A portion (about 10–12 µL) of the second C6/36 culture material was also inoculated intracranially into a litter of newborn mice. No illness or death occurred in the pups after 14 days. Animal work was done at UTMB under an approved IACUC protocol (#9505045).

To determine if SINUV replication occurred in vertebrate cells without producing CPE, additional experiments were carried out in C6/36, Vero, BHK and chick embryonic cell cultures to assay for virus replication by RT-PCR. Samples of medium from the four SINUV-inoculated cell lines were collected from day 0 to day 7, as described in the Methods section. After RNA extraction, a partial region of the PBI gene of SINUV was amplified and run on gels with expected band size between 500 to 550 pb. SINUV RNA extracted from culture fluid from the C6/36 cells from days 0 to 7 post-inoculation (dpi) displayed strong bands on all days (data not shown). In contrast, extracted and amplified viral RNA from the Vero, BHK and chick cells showed decreasing intensity of the RNA bands from day 0 to day 3. On days 4 to 7, no bands were visible, indicating that SINUV did not replicate in the three vertebrate cell lines (data not shown).

Virion morphology

In ultrathin sections of infected C6/36 cells spherical virus particles 130–140 nm in diameter were found free in cytosol. They had an envelope ~7 nm thick covered with a crown of projections ~14 nm long with ~15 nm periodicity (Figure 2).

Titration of SINUV in mosquito cells

As CoB 38d virus did not cause illness in mice, it was not possible to produce a specific mouse immune ascitic fluid (MIAF) for use in serologic tests. However, in preliminary indirect fluorescent antibody tests (IFAT), it was observed that MIAFs produced against Thogoto virus, and to a lesser extent to Dhori virus (Sbrana et al., 2007), reacted with C6/36 cells infected with CoB 38d (Fig. 3). These observations confirmed the ultrastructural studies, indicating that CoB 38d was an orthomyxovirus, probably related to Thogoto virus.

For this reason, a Thogoto virus MIAF, obtained from World Reference Center of Emerging Viruses and Arboviruses, was used in IFATs to determine the growth of CoB 38d in C6/36 cells. The TCID₅₀ of the second passage stock of CoB 38d was calculated as 10⁶ TCID₅₀/mL.

Genetic characterization of SINUV

The complete CoB 38d virus genome consisted of six RNA segments. The genome of the virus was determined to be 10,833 nucleotides (nt) in length, including the 5′ and 3′ UTRs. The length of the segments ranged from 1009 nt (segment 1) to 2376 nt (Segment 6) (Table 3). Highly conserved terminal sequences for CoB 38d were determined to be: 5′ AGTATTAACAAGAG[A/C/G]TTTC and 3′ AAAAA[T/G/C][C/T] [T/C] CTTTGTTACTACTACC. Each segment encodes for a structural protein with related functional properties as follows:

Segments 1 to 3: polymerase proteins (PA, PB1, PB2)

CoB 38d RNA segments 1–3 ranged from 2,376 to 2,000 nt in length, and encode the proteins of a replicative polymerase complex, based on their identity to the influenza virus proteins. The length open reading frame (ORF) of the segment 1 was shown to be 2,298 nucleotides in length, encoding a protein of 765 amino-acid (aa). The largest segment of SINUV shows sequence homology to orthomyxoviral Polymerase basic protein 2 or PB2 gene sequence (Pfam Id PF00604; “Flu_PB2”) (Figure 4, Table 3). T ORF of of SINUV segment 2 is 2,133 nt long (710 aa) and corresponds to orthomyxoviral Polymerase basic protein 1 or PB1 sequence (Pfam Id PF00602; “Flu_PB1”) (Table 3). ORF encoded by segment 3 of SINUV is 1,911 nt long and encodes a 636 aa of Flu-PA protein (Polymerase acidic protein or PA) (Pfam Id PF00603; “Flu_PA”) (Figure 4, Table 3).

Segment 4: Glycoprotein

ORF of segment 4 is 1,497 nt long and encodes a 498 aa. The putative glycoprotein (GP) of SINUV displayed conservation with the “baculovirus gp64 envelope glycoprotein family” (Pfam Id PF03273; “Baculo_gp64”) (Figure 4, Table 3).

The GP amino acid sequence of SINUV displayed conserved domains, which were identified as domain I (aa position 36–199), II (aa positions 21–35 and 200–267), III (271–345), IV (400–448) and V (408–427). Fusion peptides were determined as YSYQGGPLDPNTGDIE (L2) and NNNHFA (L1). A total of 16 Cys residues and 7 potential N_{Glyc} sites were found over the GP amino acid sequence. Supplementary Figure 1 summarizes the conserved domains, cysteine residues, and potential glycosylation sites for SINUV and other *Thogotovirus* members.

Segment 5: Nucleoprotein

ORF encoded by segment 5 is 1,422 nt long and encodes a 473 aa. The open reading frame (ORF) encoded by segment 5 of CoB 38d virus is conserved with respect to flu NP-like protein (Pfam Id: SSF161003; “flu NP-like”) (Table 3).

Segment 6: M-like THOV protein

The smallest RNA segment of CoB 38d virus virus encodes a ORF with 816 nt long (271aa). This segment encodes a undescribed protein of unknown function by InterProScan. Analysis using the translated nucleotide-protein Blast X program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) showed low percentage of aa similarity (23%) with the M protein of THOV

Genetic Variability

Amino acid and nucleotidic alignment analysis of individual segments of SINUV were variable and demonstrated a relative similarity with members of the genus *Thogotovirus*, family *Orthomyxoviridae* based on PB1, PA, PB2 and GP sequences (Table 4), as follows:

Segment 1 (PB2) of SINUV shares a 26.1% to 29.3% amino acid identity (39.8%–42.7% nt identity) with Dhori virus (DHOV), Bourbon virus (BRBV) and Thogoto virus (THOV). A much higher percentage of identity was displayed in the PB1 segment, which shares 54.8% to 55.3% amino acid identity (55.2%–56.8% nt identity) with THOV and DHOV. The PA segment shares 31.8% to 35.5% amino acid identity (36.2%–36.4% nt identity) with DHOV, BRBV, Batken virus (BKNV) and THOV (Table 4). The GP of SINUV shares 29.3% to 29.8% amino acid identity to DHOV, BRBV and BKNV, as well as with Upolu, Aransas Bay and Jos viruses (Table 4). The NP of CoB 38d shares 32.4% to 43.8% amino acid identity to the NP of *Thogotovirus* genus (Tables 3 and 4). Segment 6 of CoB 38d shares at a low percentage of amino acid identity (18.8% to 20.7.0%) with the putative matrix (M) of THOV (Tables 3 and 4).

Boxplot analysis

Genetic distances found among members of the genus *Thogotovirus* were significantly smaller than the values obtained between members other orthomyxovirus genera. The SINUV sequence showed 60% mean genetic variability (p values <0.05, overall p value = 0.0003567) within all genera in the family *Orthomyxoviridae* (Supplementary Figure 2, supplementary table 1). Interestingly, genetic distances within the genera *Quarantavirus* and *Thogovirus* showed relative high genetic variability with mean values of 50% and 37% respectively, in comparison with other orthomyxoviruses (Supplementary Figure 2, supplementary table 1).

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis, using the protein sequences for all segments (1 to 6) of SINUV in comparison to other orthomyxoviruses, displayed a similar topology. Phylogenetic relationships showed that CoB 38d is a new member of the family *Orthomyxoviridae*, grouping in a monophyletic cluster distinct from other orthomyxoviruses described previously (Figure 5a–f). Based on the high bootstrap supports (98–100%) in the phylogenetic trees, SINUV clearly clusters with members of the *Thogotovirus* genus (Figures 5a–f). Importantly, SINUV consistently placed in a basal position to the *Thogotovirus* genus clade, suggesting that this virus diverged at an earlier time.

Phylogenetic signals for each RNA segment (in nucleotides) were assessed and determined in overall percentage values in comparison to other members of the family

Orthomyxoviridae (*Quaranjavirus*, *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, and *Isavirus* genera) with high bootstrap values for NJ (98%) and ML trees (100%). Values of overall percentages under the three quartets and percentages of resolved trees over each genomic segment are summarized in supplementary material (Table S2, Supplementary Figure 3).

Molecular modeling and electrostatic maps of the SINUV GP protein

The stereochemical quality of the generated models presented ~90% of their residues in the most favored regions of the plot. The overall quality of the models was also evaluated using z-scores obtained from ProSA-web server. The calculated z-scores were negative and in the range of -5.02 to -6.84; these values are in agreement with good quality structures and with the z-score found for the template (-5.32) (Table S3, Supplementary Figure 4). The 3D models were also aligned with the selected template. The domains I, III and V were highly conserved in all proteins, with an average R.M.S.D of 0.67 Å, 2.41 Å and 0.21 Å, respectively. On the other hand, domain II was less conserved, with an average R.M.S.D of 6.13 Å. Notably, some of the beta-sheets on the interface of domain II and III became less structured in *envDhori* (Figure 6A). While domain II of *envSinu* and *envThogoto* have two disulfide bridges stabilizing antiparallel beta sheets, *envDhori* lacks one disulfide bridge, explaining its less ordered structure (Figure 6B). The predicted structures and electrostatic maps of SINU, THOV and DHOV glycoproteins are displayed in Figures 6C and D.

DISCUSSION

Based on its genome sequences and sizes, number of segments, and genetic characteristics (ORFs, and 5'-3' termini), SINUV is similar to members of the family *Orthomyxoviridae*. The SINUV genome is characterized by six negative-sense, single-stranded RNA segments with translated functional ORFs. The similar genes, proteins and functions (S1 to S3 related to the polymerase subunits PB1, PB2 and PA proteins; S4 encoding for the glycoprotein; S5 encoding the nucleoprotein, and S6 encoding the M-like), all support the inclusion of SINUV within the family *Orthomyxoviridae* (Figure 4, Table 3).

In order to confirm the genetic relationship of SINUV to other orthomyxoviruses, we performed a phylogenetic reconstruction, based on all complete ORFs, that confirms the multiple alignment and box plot approaches. Regardless of the analyzed RNA segment analyzed, the inferred phylogenetic trees depicted SINUV as a separate clade most closely related to members of the *Thogotovirus* genus (Figure 5a-f). Importantly, SINUV was consistently placed at a basal phylogenetic relationship to all recognized species of the genus isolated from various arthropods and vertebrates including humans. Combining all results obtained for the current analyses (genetic divergence and phylogeny) we conclude that the unique clade position, as well as the genetic similarity (protein similarity) of less than 35% for all encoded proteins indicate that SINUV represents a unique member within the family *Orthomyxoviridae*. To this date SINUV is the only known member of this genus to have a host-restricted range. Given that the observed phylogenetic reconstructions do not show a deep tree node distance to the rest of the genus members, at this time, it is impossible to reconstruct or identify ancestral host switching processes, as well as to infer the direction of

the virus spread to new hosts. Understandably the genetic diversity of this genus will be greatly enriched with future virus discovery studies in various arthropods and should provide valuable information on the properties of new divergent viruses, such as host range restriction to insects and deconstruction of their evolutionary ancestry and pathogenic potential.

Segment 6 of SINUV contains a predicted open reading frame of 271 aa which does not share sequence homology with any known protein, using protein databases (e.g. RCSB PDB, ViPR, Uniprot); but it displays a low amino acid identity of 23% with the M protein of THOV. Further studies are necessary to know the role of this segment of SINUV. Differences in the conserved segment termini are also compatible with a significant evolutionary distance of SINUV from other members of the *Thogotovirus* genus.

Although the current International Committee on Taxonomy of Viruses (2015) (ICTV) (www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp) only lists two species within the genus *Thogotovirus*, there are now actually eight viruses within the genus: Thogoto (THOV), Dhori (DHOV), Batken (BKNV), Upolu (UPOV), Aransas Bay (ABV), Jos (JOSV), Bourbon (BRBV) and Dielmo orthomyxovirus (DOV) (Allison et al., 2015, Bussetti et al., 2014, Lvov et al., 2015, Briese et al., 2014, Lambert et al., 2015, Temmam et al., 2016). The addition of SINUV to the genus will bring the total number of thogotoviruses to nine. Most of the thogotoviruses have been associated with ticks, although Batken virus has been isolated from both ticks and mosquitoes (Lvov et al, 1974), Sinu virus was isolated from mosquitoes and Dielmo orthomyxovirus was found in *Culicoides* midges (Temmam et al., 2016).

Seven of the nine thogotoviruses (THOV, DHOV, BKNV, UPOV, ABV, JOSV, and BRBV) replicate in vertebrate (Vero or BHK) cells and cause illness and death in newborn mice (CDC 2016, Lambert et al., 2015). SINUV does not, and only grew in C6/36 cells. The status of DOV is unknown, since it was identified by next-generation sequencing and not isolated. DHOV and THOV have been associated with disease (encephalitis and febrile illness) in humans (CDC, 2016), and THOV has caused abortion in sheep (Davies et al., 1984). BRBV has also been associated with febrile illness and death in humans (Kosoy et al., 2015). The disease potential of the other thogotoviruses, including SINUV, for humans and animals is unknown. With the exception of DOV, all of the other eight thogotoviruses were initially detected by culture (*in vitro*) in vertebrate or insect cell lines or by inoculation of newborn mice. However, given the tremendous number and diversity of arthropods on Earth and the increasing use of metagenomics to search for novel virus genomes in all life forms (Li et al. 2015, Temman et al. 2016, Shi et al. 2016, Paez-Espino et al. 2016) one can assume that other new thogotoviruses (and quaranjaviruses) will be discovered in non-hematophagous arthropods and other vertebrates.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgments

Acknowledgements And Support

MAC is supported by a PhD scholarship from the Colombian Department of Science (Colciencias Convocatoria 567). The fieldwork in Colombia was supported in part by Colciencias grant 111549326198. Laboratory work in the USA was funded in part by NIH grant R24 AI120942. We also acknowledge the help of Sandro Patroca da Silva in doing the Boxplot analysis and Richard Hoyos for mosquito collections.

References

- Acosta K. La economía de las aguas del río Sinú. *Economía y sociedad*. 2013; 25:79–114.
- Alcantara LC, Cassol S, Libin P, Deforche K, Pybus OG, Van Ranst M, Galvao-Castro B, Vandamme AM, de Oliveira T. A standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequences. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37(Web Server issue):W634–W642. [PubMed: 19483099]
- Allison AB, Ballard JR, Tesh RB, Brown JD, Ruder MG, Keel MK, Munk BA, Mickley RM, Gibbs SE, Travassos da Rosa AP, Ellis JC, Ip HS, Shearn-Bochsler VI, Rogers MB, Ghedin E, Holmes EC, Parrish CR, Dwyer C. Cyclic avian mass mortality in the northeastern United States is associated with a novel orthomyxovirus. *J Virol*. 2015; 89(2):1389–1403. [PubMed: 25392223]
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol*. 1990; 215(3):403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2 [PubMed: 2231712]
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *PNAS*. 2001; 98:10037–10041. [PubMed: 11517324]
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28:235–242. [PubMed: 10592235]
- Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*. 2015; 7(4):1927–1959. [PubMed: 25866904]
- Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, Vasilakis N. Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses*. 2015; 7:4911–14928. [PubMed: 26378568]
- Briese T, Chowdhary R, Travassos da Rosa A, Hutchison SK, Popov V, Street C, Tesh RB, Lipkin WI. Upolu virus and Aransas Bay virus, two presumptive bunyaviruses, are novel members of the family Orthomyxoviridae. *J Virol*. 2014; 88:5298–5309. [PubMed: 24574415]
- Bussetti AV, Palacios G, Travassos da Rosa A, Savji N, Jain K, Guzman H, Hutchison S, Popov VL, Tesh RB, Lipkin WI. Genomic and antigenic characterization of Jos virus. *J Gen Virol*. 2012; 93:293–298. [PubMed: 21994326]
- Centers for Disease Control and Prevention. Arbovirus Catalogue. 2016. <https://www.cdc.gov/arbocat/VirusBrowser.aspx>
- Chevreaux B, Pfisterer T, Drescher B, Driesel AJ, Muller WEG, Wetter T, Suhai S. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Res*. 2004; 14:1147–1159. [PubMed: 15140833]
- CVS. Diagnóstico Ambiental de la Cuenca Hidrográfica del Río Sinú. Montería. Colombia: 2004. Corporación Autónoma Regional de los Valles del Sinú y del San Jorge, 2004.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest-HPC: Fast selection of best-fit models of protein evolution. *European Conference on Parallel Processin*. 2011:177–184.
- Davies FG, Soi RK, Wariru BN. Abortion in sheep caused by Thogoto virus. *Vet Rec*. 1984; 115:654. [PubMed: 6441339]
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol*. 2012; 29:1969–1973. [PubMed: 22367748]
- Climate-Data.org. CLIMATE; San Bernardo del Viento: 2016. <http://en.climate-data.org/location/50073/> [Accessed 24 August 2016]
- Escoto-Delgadillo, M.; Flores Romero, L.; Gomez Flores-Ramos, L.; Vazquez Torres, BM.; Torres Mendoza, BM.; Vazquez Valls, E. Comparing RIP, REGA and SIMPLOT software to define the

HIV-1 recombination in Mexican population. XVII Int AIDS Conf; 3–8 August 2008; Mex City, Mex. 2008.

- Gombold JL, Raming RF. Analysis of reassortants of genome segments in mice mixedly infected with rotaviruses SA-11 and RRV. *J Virol.* 1986; 57:110–116. [PubMed: 3001336]
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003; 52:696–704. [PubMed: 14530136]
- International Committee on Taxonomy of Viruses. [Accessed 24 August 2016] *Virus Taxonomy: 2015 Releases.* 2015. www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp
- Junglen S, Drosten C. Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. *Curr Opin Microbiol.* 2013; 16:1–7. [PubMed: 23518336]
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *BMC.* 2012; 28:1647–1649.
- Kosoy OI, Lambert AJ, Hawkinson DJ, Pastula DM, Goldsmith CS, Hunt DC, Staples JE. Novel thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015; 5:760–764. DOI: 10.3201/eid2105.150150
- Lambert AJ, Velez JO, Brault AC, Calvert AE, Bell-Sakyi L, Bosco-Lauth AM, Staples JE, Kosoy OI. Molecular, serological and in vitro culture-based characterization of Bourbon virus, a newly described human pathogen of the genus *Thogotovirus*. *J Clin Virol.* 2015; 73:127–132. [PubMed: 26609638]
- Laskowski RA, Rullmann JA, MacArthur MW, Kaptein R, Thornton JM. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol Struct Dyn.* 1996; 8:477–486.
- Li C, Shi M, Tian J, Lin X, Kang Y, Chen L, Qin X, Xu J, Holmes EC, Zhang YZ. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife.* 2015; doi: 10.7554/eLife.05378
- Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol.* 1999; 73(1):152–160. [PubMed: 9847317]
- Lvov DK, Karas FR, Tsyarkin YuM, Vargina SG, Timofeev EM, Osipova NZ, Veselovskaya OV, Grebenyuk YuI, Gromashevski VL, Fomina KB. Batken virus, a new arbovirus isolated from ticks and mosquitos in Kirghiz S.S.R. *Archiv Fur Die gesamte Virusforschung.* 1974; 44:70–73. [PubMed: 4150914]
- Lvov, DK.; Shcholkanov, MY.; Alkhovsky, SV.; Deryabin, PG. *Taxonomy and Ecology.* Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2015. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia.*
- Maechler, M.; Rousseeuw, P.; Struyf, A.; Hubert, M.; Hornik, K. R package version 2.0.4. 2016. *Cluster: Cluster Analysis Basics and Extensions.*
- Paez-Espino D, Eloie-Fadros EA, Pavlopoulos GA, Thomas AD, Huntemann M, Mikhailova N, Rubin E, Ivanova N, Kyripides NC. Uncovering Earth's virome. *Nat.* 2016; doi: 10.1038/nature19094
- Pease J, Sooknanan R. A rapid, directional RNA-seq library preparation workflow for Illumina® sequencing. *Nat Methods.* 2012; 9:1–2. [PubMed: 22312634]
- Pfeiffer, W.; Stamatakis, A. Hybrid MPI/Threads parallelization of the RAxML phylogenetics code. *Parallel & Distributed Processing, Workshops and Phd Forum (IPDPSW), 2010 IEEE International Symposium;* IEEE; 2010. p. 1-8.
- Pei J, Kim BH, Grishin NV. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:2295–2300. [PubMed: 18287115]
- Rambaut, A. [Accessed 4 April 2016] FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool. 2008. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Trop Med Hyg.* 1938; 27:493–497.
- Rojas X, Giraldo P, Sierra-Correa C. Plan Integral de Manejo DMI Cispatá - La Balsa - Tinajones y sectores aledaños. *Serie de Publicaciones Especiales.* 2010; 18

- Sbrana E, Jordan R, Hraby DE, Mateo RI, Xiao SY, Siirin M, Newman PC, Travassos da Rosa AP, Tesh RB. Efficacy of the antipoxvirus compound ST-246 for treatment of severe orthopoxvirus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76:768–773. [PubMed: 17426185]
- Serrano B. The Sinú river delta on the northwestern Caribbean coast of Colombia: Bay infilling associated with delta development. *J South Am Earth Sci.* 2004; 16:623–631.
- Shen MY, Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* 2006; 15:2507–2524. [PubMed: 17075131]
- Shi M, Lin XD, Vasilakis N, Tian JH, Li CX, Chen LJ, Eastwood G, Diao XN, Chen MH, Chen X, Qin XC, Widen SG, Wood TG, Tesh RB, Xu J, Holmes EC, Zhang YZ. Divergent viruses discovered in arthropods and vertebrates revise the evolutionary history of the Flaviviridae and related viruses. *J Virol.* 2016; 90:659–669.
- Temmam S, Monteil-Bouchard S, Robert C, Baudoin JP, Sambou M, Aubadie-Ladrix M, Labas N, Raoult D, Mediannikov O, Desnues C. Characterization of viral communities of biting midges and identification of novel thogotovirus species and rhabdovirus genus. *Viruses.* 2016; 8(3):77.doi: 10.3390/v8030077 [PubMed: 26978389]
- Vasilakis N, Guzman H, Firth C, Forrester NL, Widen SG, Wood TG, Rossi SL, Ghedin E, Popov V, Blasdel KR, Walker PJ, Tesh RB. Mesoniviruses are mosquito-specific viruses with extensive geographic distribution and host range. *Virol J.* 2014; 11:97.doi: 10.1186/1743-422X-11-97 [PubMed: 24884700]
- Webb, B.; Sali, A. *Current Protocols in Bioinformatics.* Vol. 47. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2014. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller; p. 5.6.1-5.6.32.
- Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:407–410.
- Williamson DF, Parker RA, Kendrick JS. The box plot: A simple visual method to interpret data. *Ann Intern Med.* 1989; 110:916–921. [PubMed: 2719423]
- Xiao S-Y, Guzman H, Zhang H, Travassos da Rosa APA, Tesh RB. West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): A model for West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:714–721. [PubMed: 11585537]

Highlights

- A novel orthomyxovirus-related virus (designated Sinu virus) was isolated from mosquitoes in C6/36 cells.
- The complete genome of SINUV was sequenced.
- Sequence analysis indicates that SINUV is a member of the family *Orthomyxoviridae*
- SINUV is phylogenetically closest to viruses to the genus *Thogotovirus*.



Fig. 1. Location of Sinu virus isolation

A red dot indicates the location of the mosquito sampling site in the San Bernardo del Viento municipality.

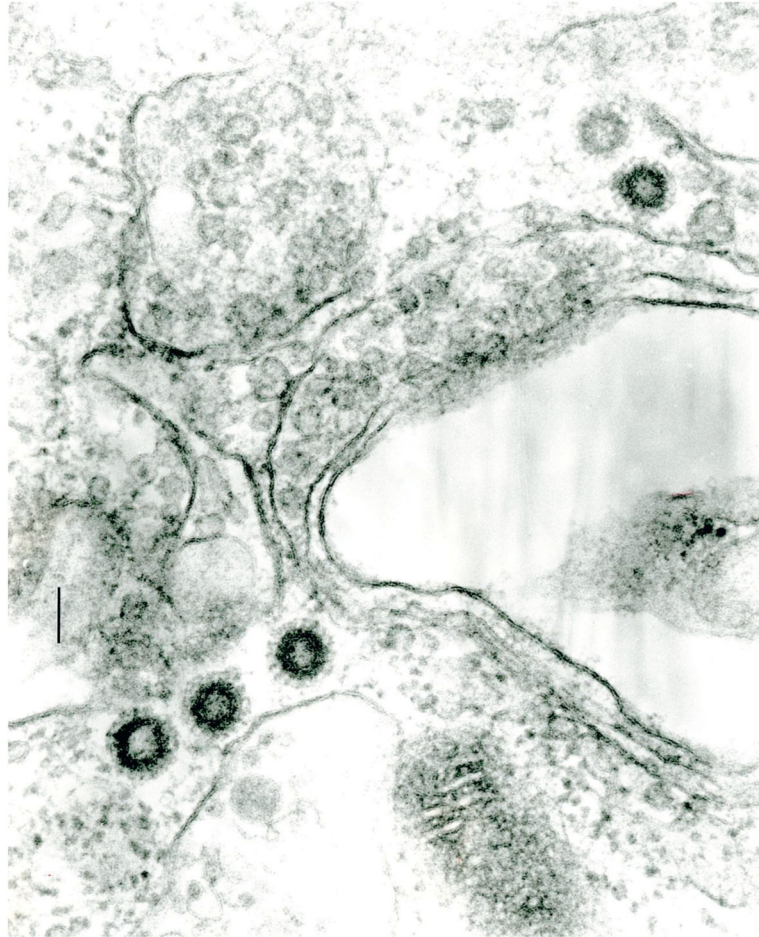


Fig. 2. Ultrastructure of CoB 38d virus in C6/36 cells
Enveloped spherical virions 130–140 nm in diameter with multiple spikes at the surface are localized free in the cytosol. Bar= 100nm.

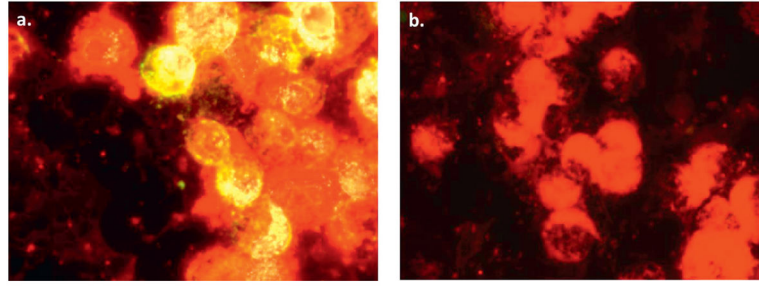


Fig. 3. Indirect fluorescent antibody (IFA) assay

(a) CoB 38d antigen in infected C6/36 cells, as detected by indirect fluorescent antibody technique (IFAT), using a Thogoto virus hyperimmune mouse ascitic fluid (HMAF). **(b)** C6/36 cell control (uninfected) stained by IFAT, using the same HMAF.

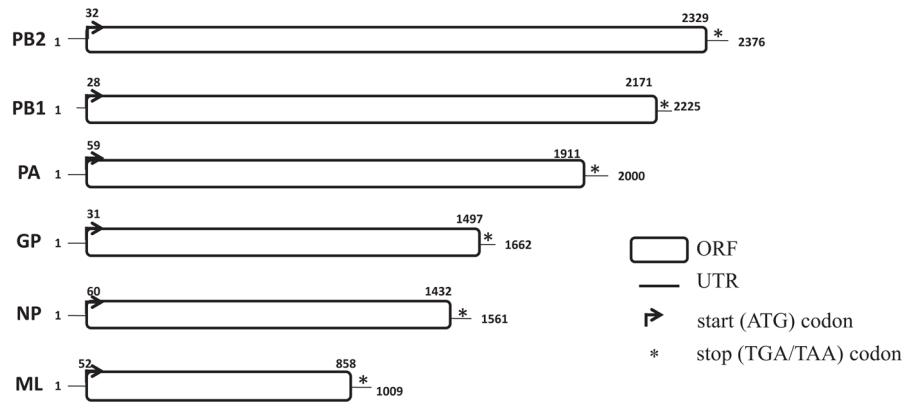
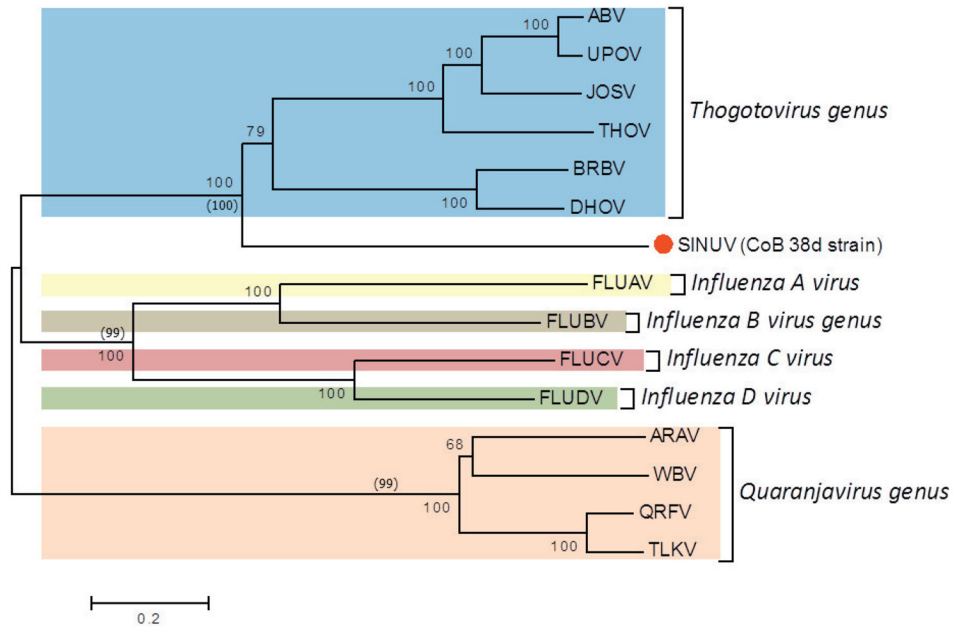


Fig. 4. Genome structure of the isolate CoB 38d

The six RNA segments are shown in positive-sense orientation (5' → 3'). Numbers indicates the nucleotide positions along the segments. Black line represents the 5' and 3' NCRs (Non Coding Regions); rectangular with rounded sides correspond to the ORFs (Open Reading Frames); Black arrows and asterisks represents the start (ATG) and stop (TGA/TAA) codons respectively.

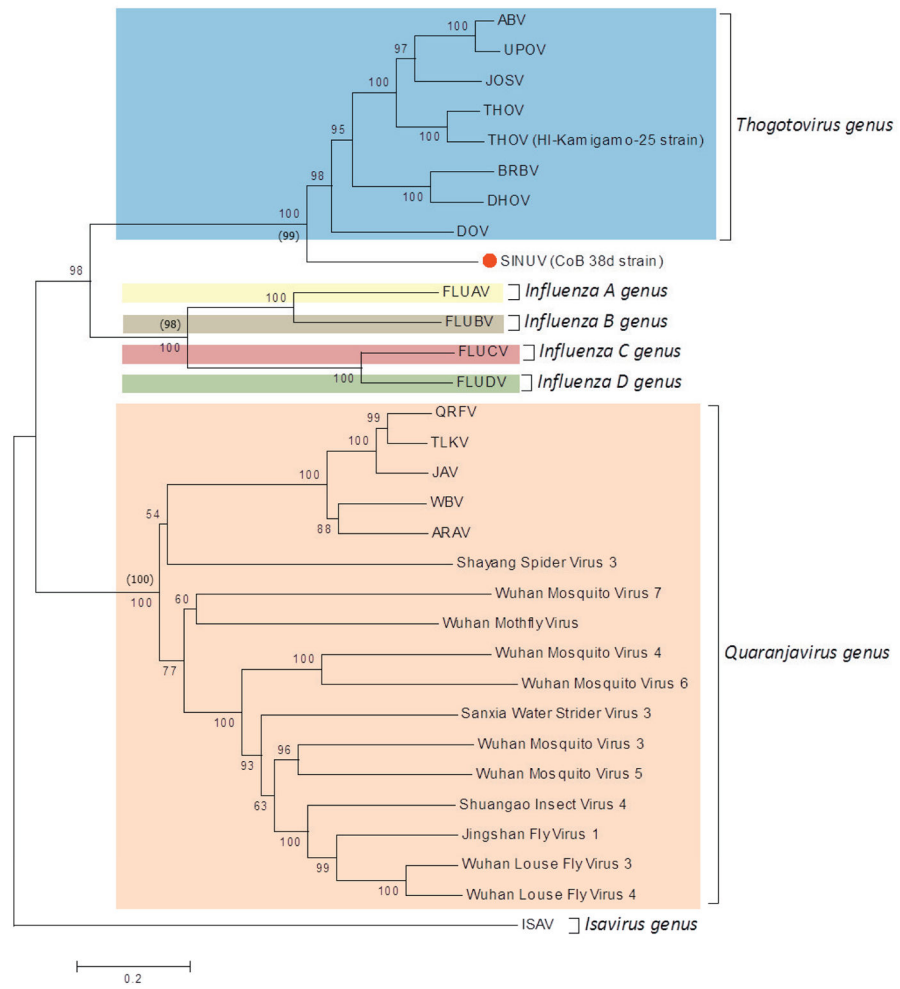


Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript



Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

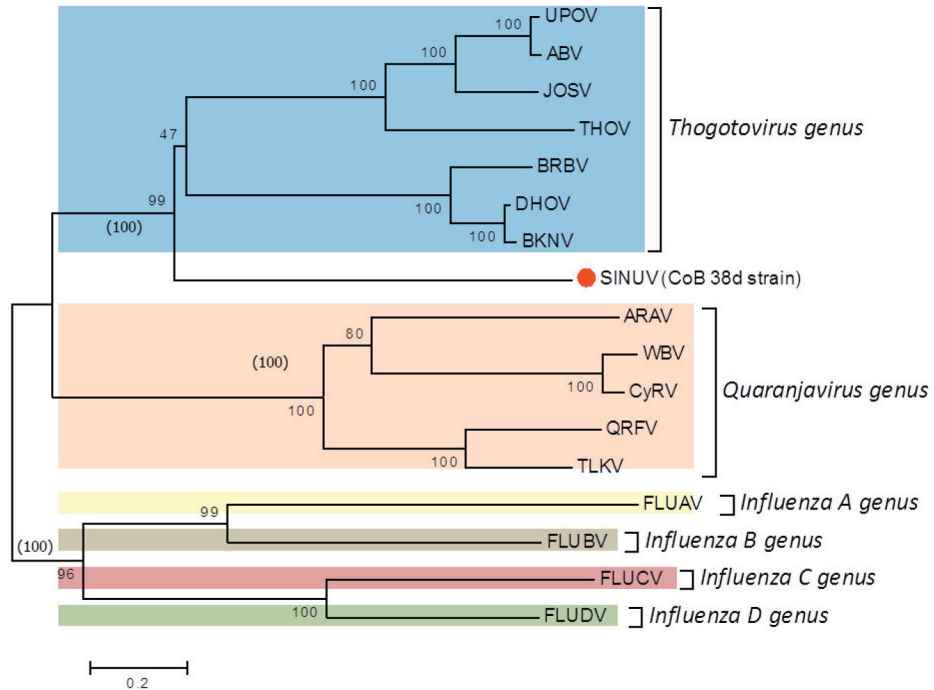
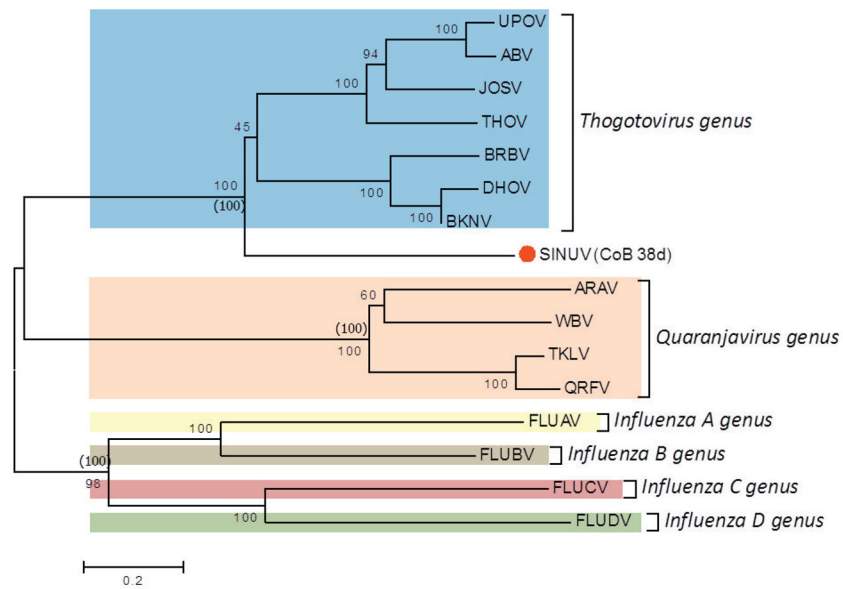


Fig. 5. Phylogenetic analysis based on (a) PB2, (b) PB1, (c) PA, (d) GP, (e) NP and (f) M-like proteins based of full length ORFs
 Values over each node of the tree correspond to the bootstrap support values for NJ and values into () correspond to ML. Bayesian posterior probability values are placed within parenthesis. Number over the bars represents the number of amino acid substitutions/site. Scale bar is representing the amino acid substitution/site.

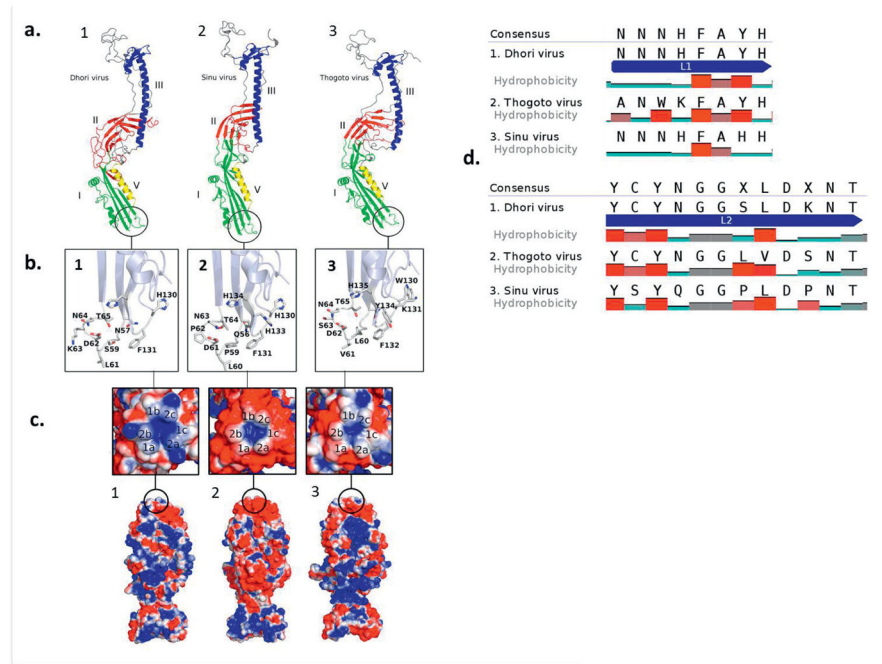


Fig. 6. Three dimensional structure of the glycoprotein (GP) (a1) DHOV; (a2) isolate CoB 38d and (a3) THOV. (b) Fusion peptide domain in detail for each virus respectively. (c) top and vertical views of the trimmer 3D structures and electrostatic charges (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c) distribution in the structure (red areas = negatively charged; white areas = neutral charge; blue areas = positively charged). (d) Alignment of the fusion peptides of DHOV, THOV and SINUV.

Table 1

Details of the isolated orthomyxovirus used in this study

Classification		strain ID	Source Isolation	Genbank Accession N°					
Genus	Virus name			Abbreviation	PB2	PB1	PA	G	NP
<i>Influenza virus A</i>	Influenza virus A	FLUAV	A/duck/Mongolia/675/2015(H3N8)	LC132933	LC132934	LC132935	LC132936	LC132937	LC132939
<i>Influenza virus B</i>	Influenza virus B	FLUBV	B/Lee/40	NC_002205	NC_002204	NC_002204	NC_002207	NC_002208	NC_002210
<i>Influenza virus C</i>	Influenza virus C	FLUCV	C/Ann Arbor/1/50	NC_006307	NC_006308	NC_006309	NC_006310	NC_006311	NC_006312
<i>Influenza virus D</i>	Influenza virus D	FLUDV	D/bovine/France/2986/2012	NC_026953	NC_026956	NC_026948	NC_026952	NC_026949	NC_026950
<i>Isavirus</i>	Infectious salmon anemia virus	ISAV	NI	NI	NC_006503	NI	NI	NI	NI
	Araguari virus	ARAV	BeAn 174214			Provided by autor			
	Cygnets River virus	CyRV	10-01646	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	Johnston Atoll virus	JAV	LBJ	NI	FJ861697	NI	FJ861696	NI	NI
	Lake Chad virus	LKCV	Ib An 38918	NI	FJ861698	NI	NI	NI	NI
<i>Quararaja virus</i>	Quararaja virus	QRV	EG T 377	GQ499302	FJ861695	GQ499303	FJ861694	JN412853	GQ499304
	Tjuloc virus	TLKV	LEIV 152K	JQ928945	JQ928944	JQ928943	JQ928941	JQ928942	JQ928946
	Wellfleet Bay virus	WBV	10-280-G	NC_025795	NC_025796	NC_025797	NC_025798	NC_025793	KM114309
<i>Thogotovirus</i>	Aranas bay virus	ABV	RML65660-8	KC506162	KC506163	KC506164	KC506165	KC506166	KC506167
	Batken virus	BKNV	LEIV-K306	NI	NI	KJ396673	KJ396674	X97340	KJ396672
	Bourbon virus	BRBV	Original	KU708253	KU708254	KP657748	KU708255	KP657749	KP657750
	Dhori virus	DHOV	1313/61	GU969308	GU969313	GU969309	GU969310	GU969311	GU969312
	Jos virus	JOSV	IBAn-17854	HM62174	HM62170	HM62175	FJ861696	HM62173	HM62172
	Thogoto virus	THOV	SiAr 126	NC_006508	NC_006495	NC_006496	NC_006506	NC_006507	NC_006504
	Upulo virus	UPOV	C5581	KC506156	KC506157	KC506158	KC506159	KC506160	KC506161
<i>Unclassified</i>	Simu virus*	SINU	CoB 38d	KX949591	KX949590	KX949589	KX949586	KX949588	KX949587

NI: No information

* Virus sequenced in this study

Table 2

Details of the orthomyxovirus described based on NGS, used in this study

Putative Classification		Source Isolation	Putative arthropod host	Country of Isolation	Genbank Accession N° to PB1 sequence
Genus	Virus name				
<i>Quarantjavirus</i>	Jingshan Fly Virus 1	True flies	<i>Atherigona orientalis</i>	China	KM817615
	Jujie Fly Virus	Horseflies	Unidentified <i>Tabanidae</i>	China	KM817616
	Sanxia Water Strider Virus 3	Water striders	Unidentified <i>Gerridae</i>	China	KM817617
	Shayang Spider Virus 3	Spiders	<i>Neoscona nautica</i>	China	KM817618
	Shuangao Insect Virus 4	Insect mix 1	Unidentified <i>Diptera</i>	China	KM817619
	Wuhan Louse Fly Virus 3	Insect mix 2	Unidentified <i>Hippoboscoidea</i>	China	KM817620
	Wuhan Louse Fly Virus 4	Insect mix 2	Unidentified <i>Hippoboscoidea</i>	China	KM817621
	Wuhan Mosquito Virus 3	Mosquito Hubei	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	China	KM817622
	Wuhan Mosquito Virus 4	Mosquito Hubei	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	China	KM817623
	Wuhan Mosquito Virus 5	Mosquito Hubei	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	China	KM817624
<i>Thogotovirus</i>	Wuhan Mosquito Virus 6	Mosquito Hubei	<i>Culex quinquefasciatus</i>	China	KM817625
	Wuhan Mosquito Virus 7	Mosquito Hubei	<i>Anopheles sinensi</i>	China	KM817626
	Wuhan Mothfly Virus	Insect mix 4	<i>Psychoda alternata</i>	China	KM817627
	DieImo orthomyxovirus	<i>Culicoides imicola</i>	<i>Culicoides imicola</i>	Senegal	Provided by autor (Temmand et al., 2016)

Genomic characteristic of SINUV based on each genome length, terminal UTR sequences (5' and 3'), ORFs, and 3'-5' terminal site conservative

Table 3

Segment	Segment length (nt)	5' UTR length (nt)	5' terminal site conservative	ORF (nt)	ORF (aa)	3' UTR length (nt)	3' terminal site conservative	FLUAV/THOV homolog
S1	2376	31	AGTAITTAACAAGAGATTTC	2298 (32->2329)	765	47	AAAAAFTCTTTTGTACTACTACC	PB2
S2	2225	28	AGTAITTAACAAGAGCTTTA	2133 (29->2171)	790	54	AAAAAGCTCTTTGTACTACTACC	PB1
S3	2000	59	AGTAITTAACAAGGACTTTA	1911 (60->1970)	636	30	AAAAAGTCCTTTGTACTACTA --	PA
S4	1662	31	AGTAITTAACAAGAGCTTTA	1497 (32->1578)	498	84	AAAAAGCTCTTTGTACTACT ---	GP
S5	1561	60	AGTAITTAACAAGAGGT - - -	1422 (61->1432)	473	79	AAAAA CCTCTTTGTACTACT - - -	
S6	1009	52	AGTAITTAACAAGAGG - - TC	816 (53->858)	271	141	AAAAA CCTCTTTGTACT - - - - -	M-like
Total genome length	10833							

nt, nucleotides; aa, amino acids.

Boldface indicate a divergence; -, gap

ARTÍCULO ORIGINAL

Infeción de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) con el genotipo asiático-americano del virus del dengue serotipo 2 en Medellín y su posible papel como vector del dengue en Colombia

Andrés Gómez-Palacio¹, Juan Suaza-Vasco^{2,3}, Sandra Castaño⁴, Omar Triana⁴, Sandra Uribe²

¹ Grupo de Investigación en Ciencias Biomédicas, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia

² Grupo de Sistemática Molecular, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

³ Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

⁴ Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Introducción. *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* son reconocidos vectores de arbovirus como los del dengue, la fiebre amarilla, el chikungunya y el Zika, en regiones tropicales y subtropicales del mundo. En Colombia, la distribución geográfica de *Ae. albopictus* ha sufrido un incremento y hoy incluye ciudades como Cali y Medellín. Hasta ahora, sin embargo, no se ha recabado información concluyente sobre su infección viral y su capacidad de transmisión a los humanos.

Objetivo. Determinar la infección natural por dengue en ejemplares de *Ae. albopictus* recolectados en un área urbana de Medellín.

Materiales y métodos. Se recolectaron individuos de *Ae. albopictus* en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Se confirmó su clasificación taxonómica mediante el análisis del gen citocromo oxidasa I (*COI*), y se extrajo el ARN total para la identificación del virus del dengue y de los respectivos serotipos. La presencia del genotipo DENV se infirió mediante el análisis del gen *NS3*.

Resultados. El análisis del *COI* corroboró el estatus taxonómico de *Ae. albopictus*. Uno de los mosquitos procesados fue positivo para DENV-2 y el análisis del *NS3* mostró una gran similitud con el genotipo asiático-americano.

Conclusión. Se reporta la infección con DENV-2 en *Ae. albopictus* en Medellín, Colombia. La presencia del genotipo asiático-americano en una zona urbana sugiere su posible circulación entre humanos y en *Ae. albopictus*, lo cual alerta sobre su eventual papel en la transmisión del DENV-2, y sobre la necesidad de incluir esta especie en la vigilancia entomológica en Colombia.

Palabras clave: *Aedes*; control de vectores; virus del dengue; genotipo; filogenia; Colombia.

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3474>

***Aedes albopictus* (Skuse, 1894) infected with the American-Asian genotype of dengue type 2 virus in Medellín suggests its possible role as vector of dengue fever in Colombia**

Introduction: *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* are recognized vectors of dengue, yellow fever, chikungunya and Zika arboviruses in several countries worldwide. In Colombia, *Ae. albopictus* geographical distribution has increased to include highly populated cities such as Cali and Medellín. Although this species has been frequently found in urban and semi-urban zones in the country, its role as vector of the dengue fever is poorly known.

Objective: To identify the presence of *Ae. albopictus* specimens naturally infected with dengue virus collected in Medellín.

Materials and methods: Insects were collected in the *Universidad Nacional de Colombia* campus in Medellín. Individuals were classified as *Ae. albopictus* and confirmed by DNA barcode region analysis. Mosquitoes were processed for dengue virus identification, and a fragment of the *NS3* gen was sequenced and compared with DENV-2 genotypes reported in the literature.

Results: Sequence analysis of *COI* indicated *Ae. albopictus* individuals were similar to those recently reported in Colombia, and genetically close to those from other regions worldwide. Among the pools tested one was positive for DENV-2, and the *NS3* analysis indicated it belonged to the Asian-American clade.

Contribución de los autores:

Andrés Gómez-Palacio: concepción y análisis del estudio, escritura del manuscrito

Juan Suaza-Vasco: recolección de ejemplares y desarrollo del trabajo en campo

Sandra Uribe: participación en todas las etapas de la investigación

Todos los autores participaron en la clasificación taxonómica y los análisis genéticos y moleculares.

Conclusion: We report the presence *Ae. albopictus* naturally infected with the Asian-American genotype of DENV-2 in Colombia. The presence of *Ae. albopictus* specimens carrying the most common genotype infecting humans in a highly populated city such as Medellín indicates its potential role as dengue vector in Colombia and highlights the relevance of including it in current vector surveillance strategies.

Key words: *Aedes*; vector control; dengue virus; genotype; phylogeny; Colombia

doi: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3474>

Se cree que, al igual que *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762), *Ae. (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) es una especie importante en la transmisión de arbovirus como los del dengue, la fiebre amarilla, el chikungunya y el Zika en diversas regiones del mundo. No obstante, su papel real como vector en Latinoamérica apenas comienza a estudiarse (1).

La fiebre por dengue se reconoce ampliamente como una de las infecciones virales con mayor incidencia en el mundo, tal como ocurre en grandes ciudades de Colombia, como Medellín, Cali y Cúcuta, entre otras. La infección es causada por algunos de los genotipos que componen el acervo genético de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 a DENV-4). El surgimiento de los focos epidémicos de dengue y de la fiebre hemorrágica por dengue se ha asociado a la presencia de uno cualquiera de estos cuatro serotipos, así como a la circulación simultánea de genotipos debida a la colonización o al surgimiento de linajes más patógenos en un periodo determinado (2). Se han descrito cinco genotipos epidémicos del DENV-2: el asiático I (AS-I), el asiático II (AS-II), el asiático-americano (AS/AM), el cosmopolita (COS) y el americano (AM) (3), de los cuales el AM y el AS/AM son los más frecuentemente asociados a focos epidémicos de dengue en muchas regiones tropicales y subtropicales de Suramérica, incluida Colombia (4).

Aedes albopictus es originario del oriente de India (5), desde donde se dispersó por el oeste hasta las islas Mauricio y Madagascar y, posteriormente, colonizó múltiples regiones en el continente americano. En América se ha reportado desde 1981 en los Estados Unidos (6), país en el cual se distribuye ampliamente, incluso en zonas con presencia de *Ae. aegypti*, por lo que representa un gran riesgo para la población y un importante reto para las autoridades de salud (7). *Aedes albopictus* se

encuentra también en México (8) y en diversos países de Centroamérica. En Suramérica, *Ae. albopictus* se detectó en Brasil en 1986 (9), donde la especie se ha distribuido rápidamente hacia zonas urbanas (10), y se ha evidenciado como vector del virus del dengue (11). También se ha reportado en Argentina (12), desde donde se cree que ha seguido dispersándose hacia las regiones más al norte del Cono Sur. Aunque su rango de expansión es aún difícil de precisar, continúa siendo objeto de interés por su potencial papel como vector (1,5).

En Colombia, *Ae. albopictus* se reportó inicialmente en 1998 en la ciudad de Leticia, en el departamento de Amazonas, limítrofe con Brasil (13). Años más tarde, se reportó en Cali (14) y, más recientemente, en el municipio de La Tebaida, departamento del Quindío (15), y en Istmina, departamento del Chocó, limítrofe con Panamá (16). En Medellín, la presencia de *Ae. albopictus* ha sido constante desde el 2011, y frecuentemente se han encontrado individuos en zonas céntricas de la ciudad como el Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe (17) y el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (18).

A pesar de su importancia como potencial vector del dengue y otros arbovirus en Colombia, la información sobre su ecología y evolución, así como sobre su papel epidemiológico, es aún escasa. El único trabajo publicado hasta la fecha sobre la infección viral en *Ae. albopictus* en el país, se hizo en individuos recolectados en el municipio de Buenaventura (Valle del Cauca) durante los años 2002 y 2004 (19). En ese estudio se reportó la infección natural de *Ae. albopictus* con el DENV-1 y el DENV-2, y se sugirió su posible papel en la dinámica de transmisión del dengue en esa localidad (19). En el resto del país, a pesar de que la especie se viene reportando cada vez con mayor frecuencia, persiste un gran desconocimiento sobre su capacidad de infección, así como sobre los serotipos y los genotipos virales circulantes.

En el presente trabajo se reporta la infección de *Ae. albopictus* con el genotipo asiático-americano del DENV-2 en Medellín y se aporta información sobre el posible origen de este vector en el Valle de Aburrá.

Correspondencia:

Andrés Gómez-Palacio, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Avenida Central del Norte N° 39-115, Tunja, Colombia

Teléfono: (758) 740 5626
amgomezpa@gmail.com

Recibido: 10/08/16; aceptado: 28/07/17

Materiales y métodos

Insectos y extracción de ADN

Se recolectaron nueve individuos en áreas de fitotelmata en un relicto de bambú americano (*Guadua* sp.) y en un árbol de jardín (*Ficus* sp.) (figura 1) durante enero y febrero de 2016 en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, localizado en el área urbana de la ciudad.

Los mosquitos se almacenaron vivos en tubos cónicos de 1,5 ml hasta su identificación taxonómica con la clave de Forattini (20). A cinco de los nueve mosquitos se les removieron las dos patas posteriores para su validación molecular usando el gen citocromo oxidasa I (*COI*). Se extrajo el ADN total de cada ejemplar utilizando solución tampón de macerado según protocolo previamente reportado para mosquitos (21). Los restos de los mosquitos se almacenaron en RNAlater® en grupos compuestos por uno a cuatro individuos según el lugar de su captura, para su posterior procesamiento.

Amplificación del gen *COI* en *Aedes albopictus*

Se amplificó un fragmento de 700 pares de bases (pb) del gen *COI*, propuesto como el código de barras genético en diferentes organismos (22), mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los iniciadores MTNF y MTNR, como se ha reportado previamente (23).

Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 60 segundos, a 50 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante otros 60 segundos, y una etapa de extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Todos los productos positivos se purificaron y se enviaron a la empresa MacroGen (<http://dna.macrogen.com>) para su secuenciación.

Extracción del ARN, síntesis del ADN complementario y tipificación del DENV

En cada grupo de mosquitos se extrajo el ARN total usando el estuche RNeasy Mini Kit® (Qiagen) según el protocolo recomendado por el fabricante. Para la síntesis del ADN complementario de un fragmento de 470 pb del gen *NS3*, se hizo una PCR con transcripción inversa (*reverse transcription*-PCR, RT-PCR) usando el iniciador DV3 (5'-AARTGIGCYTCRTCCAT-3') previamente reportado para dengue (24). Las condiciones de la



Figura 1. Lugares de recolección de *Ae. albopictus* en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (coordenadas geográficas: 6°26'07,5"N, -75°57'69,8"O; World Geodetic System, WGS 84) Fotos: Alejandra M. Clavijo

RT-PCR consistieron en un volumen final de 20 µl de una mezcla que contenía 10 µl de ARN total, 4 µl de solución tampón (5x), 2 µl de dNTP (10 mM), 2 µl del iniciador DV3 (10 µM), y 2 µl de 20 x 10³ U/µl de transcriptasa inversa (Thermo®). Esta mezcla se amplificó durante un ciclo de 60 minutos a 42 °C seguido por un ciclo de 10 minutos a 90 °C, según protocolo descrito previamente (24).

El DENV se tipificó mediante una PCR semianidada en dos pasos: inicialmente se usaron los iniciadores DV1 (5'-GGRACKTCAGGWTCTCC-3') y DV3 (24) para amplificar un fragmento de 470 pb del gen *NS3*. Las condiciones de la PCR consistieron en un volumen final de 25 µl que contenía 3 µl de ADNc, 2,5 µl de solución tampón (10x), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de dNTP (2 mM), 0,5 µl de los iniciadores DV1 y DV3 (10 µM), y 5U/µl de polimerasa (Thermo®).

El perfil de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante un minuto, seguida de 30 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 50 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante 40 segundos para cada uno y, por último, una extensión a 72 °C durante cinco minutos. Posteriormente, se

hizo una segunda amplificación que incluyó el iniciador DV1 y los iniciadores específicos DSP1 (5' – AGTTTCTTTTCTAAACACCTCG – 3'); DSP2 (5' – CCGGTGTGCTCRGCYCTGAT – 3'); DSP3 (5' – TTAGAGTYCTTAAGCGTCTCTTG – 3') y DSP4 (5' – CCTGGTTGATGACAAAAGTCTTG – 3'), los cuales amplifican tamaños de 169, 362, 265 y 426 pb para cada uno de los cuatro serotipos del DENV, respectivamente (25).

En esta PCR se empleó un volumen final de 25 µl que contenía 3 µl de ADNc, 2,5 µl de solución tampón (10x), 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de dNTP (2 mM), 1,25 µl del iniciador DV1 y de cada uno de los iniciadores específicos DSP1 a DSP4 (10 µM), y 5 U/µl de polimerasa (Thermo®).

El perfil de amplificación consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante cuatro minutos, seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, a 52 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante 30 segundos para cada uno; finalmente, se hizo una etapa de extensión a 72 °C durante cinco minutos.

Los productos de la amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, y los productos positivos se enviaron, para su posterior purificación y secuenciación, a la empresa Macrogen (<http://dna.macrogen.com>).

Análisis de secuencias y tipificación genética del DENV

Las secuencias de nucleótidos obtenidas tanto para el gen *COI* en *Ae. albopictus* como para el gen

NS3 del DENV, se ajustaron manualmente usando el programa Bioedit, versión 7.0 (26); todos los alineamientos se hicieron usando la opción “auto” del programa MAFFT, versión 7.2 (27).

Las secuencias del *COI* se compararon con 17 secuencias tomadas del Genbank obtenidas de individuos de 14 países de diferentes regiones de África, América, Asia, Europa y Oceanía (cuadro 1). Además, se incluyeron 13 secuencias de individuos recolectados en el municipio de La Tebaida, Quindío (15). Para la confirmación molecular de la taxonomía de *Ae. albopictus*, se construyó una red haplotípica usando el algoritmo *median-joining* con el programa Network, versión 5.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/>). Para la identificación del genotipo del DENV, las secuencias obtenidas se compararon con las de la base de datos del genoma del DENV mediante el programa Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Posteriormente, se hizo el alineamiento de la secuencia parcial de 307 pb del *NS3* con 19 secuencias (cuadro 2) de los genotipos reportados en América (2). A partir de la base de datos compuesta por las secuencias del gen *NS3* del DENV, se estimó la distancia génica pareada basada en el modelo de sustitución de dos parámetros de Kimura (K2-p) (36) y a continuación se construyó un dendrograma de distancias para cada conjunto de datos basado en el algoritmo *neighbor-joining* con el programa MEGA, versión 6.0.6 (37). El sustento estadístico de los nodos se probó mediante *bootstrap* con 1.000 iteraciones (38).

Cuadro 1. Origen de las secuencias del gen *COI* de *Aedes albopictus* incluidas en este estudio

Continente	País	Código en la figura 2	Genbank	Referencia
África	Camerún	Camerún	JF309317	(28)
	Madagascar	Madagascar	AJ971007	(28)
	Francia (*La Reunión)	Fran_Reu	JN406658	(29)
América	Brasil	Brasil	AJ971003 , AJ971014	(30)
	Colombia	Col_LaTeb	KP877563 - KP877575	(15)
		Col_Med	Este reporte	
	Costa Rica	CosRica	AB907798	(31)
	Estados Unidos	EEUU	KC690940 , KC690944	(32)
	Estados Unidos (*Hawai)	EEUUh	KC690958	(32)
	Panamá	Panamá	AB907801	(31)
Asia	India	India	AY729984	(23)
	Singapur	Singapur	KC690926	(32)
Europa	Alemania	Alemania	JX675570	(33)
	Croacia	Croacia	HQ906851	(34)
	Italia	Italia	KC690936	(32)
Oceanía	Australia	Australia	KC572145	(35)
	Papúa Nueva Guinea	PN_Gui	KC572496	(35)

* Departamento o estado de ultramar del respectivo país

Cuadro 2. Descripción de las secuencias de DENV-2 usadas en este trabajo

Genotipo	País	Aislamiento	Año	Genbank
AS/AM	Martinica	98-703	1998	AF208496
	Belice	BID-V2952	2002	FJ898461
	Guatemala	FDA-GUA09	2009	HQ999999
	Nicaragua	BID-V2683	1999	GQ199895
		BID-V2346	2000	FJ850061
		BID-V2659	2000	FJ850062
		BID-V1721	2008	FJ205885
AM		BID-V4915	2009	HQ705625
	Tonga	Tonga74	1974	AY744147
	Venezuela	Ven2	1987	AF100465
	México	131	1992	AF100469
	Perú	IQT2913	1996	AF100468
AS-I	Tailandia	ThD2 0168	1979	DQ181805
		ThD2 0498	1984	DQ181804
		ThD2 0078	2001	DQ181797
AS-II	Nueva Guinea	New_	1944	AF038403
		Guinea_C		
COS	Australia	TSV01	1993	AY037116
	China	FJ11	1999	AF359579
	Indonesia	BA05i	2004	AY858035

La información de los genotipos se tomó de Añez, *et al.* (2).

Resultados

Análisis del gen COI en *Aedes albopictus* de Medellín

Se encontró un mismo haplotipo para el fragmento del gen *COI* analizado en los cinco individuos de *Ae. albopictus* recolectados en el municipio de Medellín, similar al observado en la mayoría de los individuos colombianos del municipio de La Tebaida en el Quindío (15) y de un individuo de la isla de Papúa, Nueva Guinea (35) (figura 2). No se encontró ninguna diferencia significativa entre los haplotipos de los distintos orígenes geográficos, ya que no los separan más de cuatro pasos de mutación (figura 2).

Genotipificación del DENV-2 e identificación del genotipo viral

Solo en uno de los tres grupos de insectos evaluados, la amplificación tuvo un tamaño similar al esperado para la presencia del DENV-2 (figura 3). El análisis filogenético del DENV-2 ubicó la secuencia identificada en *Ae. albopictus* de Medellín dentro del clado compuesto por los aislamientos pertenecientes al genotipo asiático-americano, con un alto sustento de nodo (*bootstrap*=100) y claramente diferenciado de los restantes genotipos (figura 4). Cabe resaltar que dentro del genotipo asiático-americano la secuencia del fragmento del gen *NS3* de *Ae. albopictus* mostró más similitud

con el aislamiento más antiguo (1998) e insular (Martinica) que con los restantes, más recientes y continentales (figura 4).

Discusión

El tigre asiático, como se conoce a *Ae. albopictus*, es considerado uno de los vectores de arbovirus más invasivos y ampliamente distribuidos en el mundo. Desde su ingreso al continente americano, presumiblemente en la década de los años 80, este insecto ha ido incrementando paulatinamente su distribución geográfica en áreas densamente pobladas con buenas condiciones de saneamiento, lo que llama la atención sobre su real papel en la emergencia y reemergencia de importantes virosis como el dengue, el chikungunya y el Zika.

A diferencia de *Ae. aegypti*, sobre cuyo origen y procesos de dispersión en América se han propuesto distintas hipótesis (39), hasta el momento no hay un consenso claro sobre la historia demográfica de *Ae. albopictus* y, menos aun, sobre los procesos que dieron origen a las poblaciones americanas (32). A pesar de que el primer registro de esta especie en Colombia data de más de 19

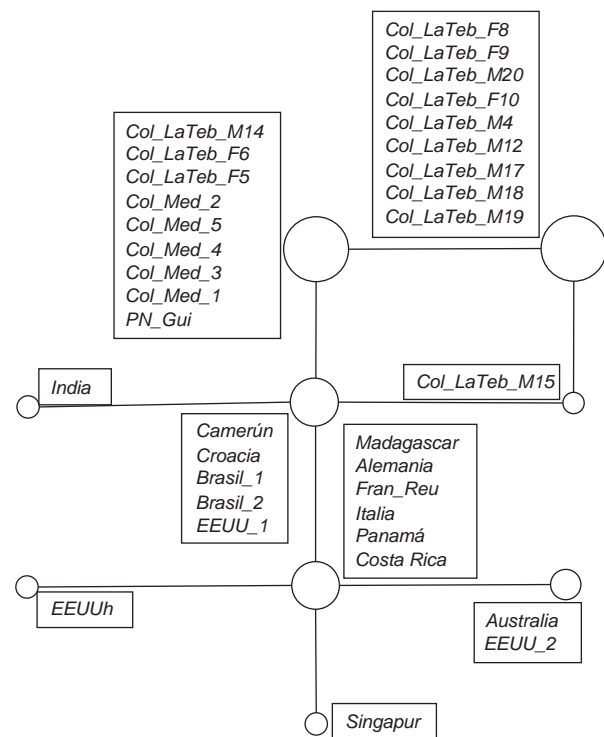


Figura 2. Red haplotípica estimada mediante el algoritmo *median-joining* del gen *COI* en *Ae. albopictus*. El tamaño de los círculos indica la frecuencia haplotípica y las líneas que conectan los haplotipos indican un paso mutacional. Los detalles del origen de las secuencias se presentan en el cuadro 1.

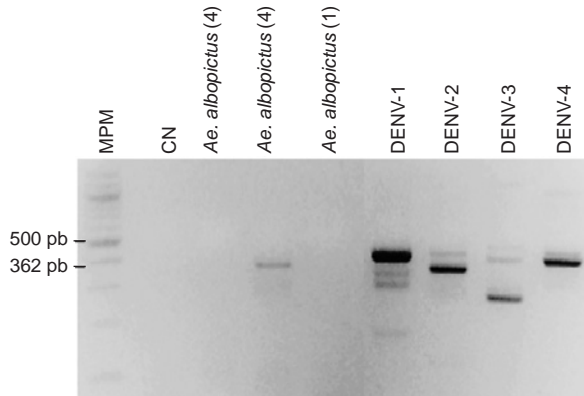


Figura 3. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se visualiza la amplificación de un fragmento aproximado de 362 pb indicativo de la presencia de DENV-2 en un grupo de individuos de *Ae. albopictus* recolectados en Medellín. Los números entre paréntesis indican el número de insectos incluidos en cada grupo según el sitio de recolección. MPM: marcador de peso molecular; CN: control negativo

años, muy poco se ha estudiado su composición y estructura poblacional. En el trabajo más reciente se sugiere que las poblaciones colombianas, particularmente las del municipio de La Tebaida en

Quindío, tienen un origen asiático (de Singapur) (15), dada la similitud de nucleótidos de los haplotipos del gen *COI* en este municipio, con dos haplotipos de Singapur reportados en un estudio anterior (32).

En este trabajo se encontró que los individuos de *Ae. albopictus* recolectados en Medellín presentaban el mismo haplotipo del *COI* reportado para varios de los individuos de La Tebaida e, igualmente, se observó una relación cercana con los demás haplotipos de *Ae. albopictus* en diversos países del mundo. Estos resultados aportan información comprobada en apoyo de la hipótesis de un único origen ancestral asiático de las poblaciones colombianas (ampliamente aceptado) y eventualmente permitirían sugerir una composición panmítica de las poblaciones de este vector en Colombia. No obstante, debido a la ausencia de información concluyente y de un tamaño de muestra representativo, no es posible establecer un país o lugar puntual de origen, ni una clara estructura o composición poblacional de *Ae. albopictus* en Colombia. En este sentido, llamamos la atención sobre la necesidad de desarrollar estudios que indaguen sobre su filogeografía y estructura poblacional en el país.

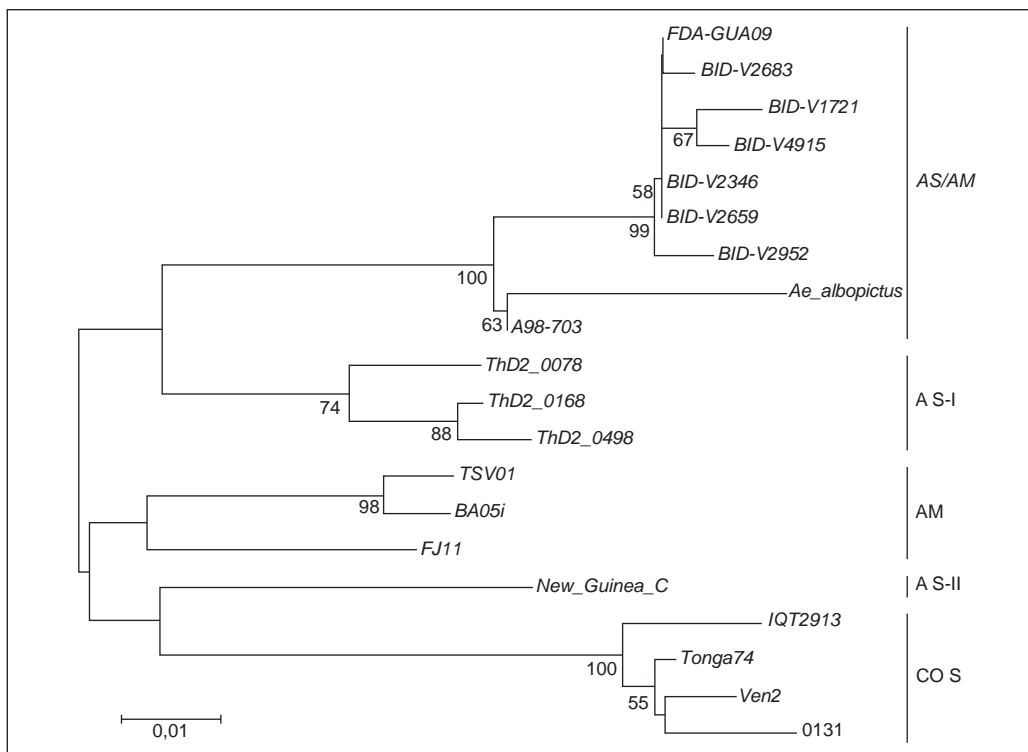


Figura 4. Dendrograma de distancias genéticas basadas en K2-p de un fragmento de 307 pb del gen *NS3* del DENV-2. Se muestran los clados correspondientes a los genotipos del DENV-2 reportados en Añez, et al. (2); se incluye el encontrado en *Aedes albopictus* de Medellín en este trabajo. Los números bajo los nodos indican el valor de *bootstrap* obtenido de 1.000 iteraciones (solo se muestran los valores >50).

La presencia de *Ae. albopictus* naturalmente infectado con DENV-1 y DENV-2 en Colombia, se reportó inicialmente en el municipio de Buenaventura, Valle del Cauca (19). Allí se observó la concurrencia de *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti* durante el periodo de estudio (2002-2004), así como una correlación positiva entre la tasa de infección entomológica y el incremento en el número de casos positivos de dengue en humanos (19). Aunque estos resultados no demuestran la incriminación vectorial de *Ae. albopictus*, su participación en la dinámica de transmisión del dengue a los humanos no puede descartarse.

En el presente estudio se reporta la presencia de *Ae. albopictus* infectado con DENV-2 en Medellín. Este hallazgo concuerda con lo reportado en Buenaventura, por lo cual también podría considerarse su eventual papel en la dinámica de transmisión del dengue en esta ciudad. Además, los resultados presentados indican la circulación del genotipo asiático-americano del DENV-2 en *Ae. albopictus* de Medellín. Este es el genotipo más frecuente en América desde los años 90, y en Colombia se ha reportado frecuentemente en pacientes febriles con cuadro clínico indicativo de dengue en cuadros todo el país (4), por lo que se sugiere que *Ae. albopictus* puede tener un papel en la transmisión del dengue a los humanos. Sin embargo, esta hipótesis, así como el grado de riesgo epidemiológico atribuible a *Ae. albopictus*, deberá comprobarse en futuros estudios.

Teniendo en cuenta el potencial papel de *Ae. albopictus* como vector en Colombia, se propone que esta especie se incluya en las estrategias de vigilancia y control vectorial del dengue en el país. En este sentido, es importante mencionar que desde el hallazgo de *Ae. albopictus* en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, en enero y febrero de 2016, periódicamente se hace la revisión y la descripción de sus criaderos, así como la recolección de adultos para el estudio de diversos aspectos de su ciclo de vida bajo condiciones de laboratorio, y la evaluación de su infección con el virus del dengue mediante RT-PCR.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Universidad de Antioquia y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia.

Referencias

1. **Rúa-Uribe GL, Suárez-Acosta CR, Rojo RA.** Implicaciones epidemiológicas de *Aedes albopictus* (Skuse) en Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2012;30:328-37.
2. **Añez G, Morales-Betoulle ME, Ríos M.** Circulation of different lineages of dengue virus type 2 in Central America, their evolutionary time-scale and selection pressure analysis. PLoS One. 2011;6:e27459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027459>
3. **Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al.** Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. Virology. 1997;230:244-51. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8504>
4. **Méndez JA, Usme-Ciro JA, Domingo C, Rey GJ, Sánchez JA, Tenorio A, et al.** Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. Virol J. 2012;9:64. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-64>
5. **Rey JR, Lounibos P.** Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y transmisión de enfermedades. Biomédica. 2015;35:177-85. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i2.2514>
6. **Sprenger D, Wuthiranyagool T.** The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. J Am Mosq Control Assoc. 1986;2:217-9.
7. **Porse CC, Kramer V, Yoshimizu MH, Metzger M, Hu R, Padgett K, et al.** Public health response to *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes invading California, USA. Emerg Infect Dis. 2015;21:1827-9. <https://doi.org/10.3201/3210.150494>
8. **Ibáñez-Bernal S, Briseño B, Mutebi JP, Argot E, Rodríguez G, Martínez-Campos C, et al.** First record in America of *Aedes albopictus* naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, México. Med Vet Entomol. 1997;11:305-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00413.x>
9. **Forattini OP.** Identification of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Brazil. Rev Saúde Pública. 1986;20:244-5. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101986000300009>
10. **Honório NA, da Costa Silva W, Leite PJ, Gonçalves JM, Lounibos LP, Lourenço-de-Oliveira R.** Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:191-8. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000200005>
11. **Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araújo FM, De Simone SG, Dutra RF, et al.** Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. PLoS One. 2012;7:e41386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041386>
12. **Vezzani D, Carbajo AE.** *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103:66-74. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008005000003>
13. **Vélez ID, Quiñones ML, Suárez M, Olano V, Murcia LM, Correa E, et al.** Presencia de *Aedes albopictus* en Leticia, Amazonas, Colombia. Biomédica. 1998;18:192-8. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v18i3.990>

14. **Cuéllar-Jiménez ME, Velásquez-Escobar OL, González-Obando R, Morales-Reichmann CA.** Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Cali, Valle del Cauca, Colombia. *Biomédica*. 2007;27:273-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i2.224>
15. **Zamora-Delgado J, Castaño JC, Hoyos-López R.** DNA barcode sequences used to identify *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in La Tebaida (Quindío, Colombia). *Rev Col Entomol*. 2015;41:212-7.
16. **Carvajal JJ, Honorio NA, Díaz SP, Ruiz ER, Asprilla J, Ardila S, et al.** Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en el municipio de Istmina, Chocó, Colombia. *Biomédica*. 2016;36:438-46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.2805>
17. **Rúa-Uribe G, Suárez-Acosta C, Londoño V, Sánchez J, Rojo R, Bello-Novoa B.** Primera evidencia de *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) en la ciudad de Medellín, Antioquia - Colombia. *Revista Salud Pública de Medellín*. 2011;5:89-98.
18. **Suaza JD, Barajas J, Galeano E, Uribe S.** Criaderos naturales para *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) y *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) vectores de arbovirus en la ciudad de Medellín (Antioquia, Colombia). *Boletín del Museo Entomológico Francisco Luis Gallego*. 2013;5:18-24.
19. **Méndez F, Barreto M, Árias JF, Rengifo G, Muñoz J, Burbano ME, et al.** Human and mosquito infections by dengue viruses during and after epidemics in a dengue-endemic region of Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74:678-83. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.678>
20. **Forattini OP.** Culicidología médica. Identificação, biologia, epidemiologia. São Paulo: Editora Da Universidade de São Paulo; 2002. p. 860.
21. **Soto SI, Lehmann T, Rowton ED, Vélez ID, Porter CH.** Speciation and population structure in the morphospecies *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) as derived from the mitochondrial *ND4* gene. *Mol Phylogenet Evol*. 2001;18:84-93. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0863>
22. **Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci*. 2003;270:313-21. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
23. **Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P.** DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2007;44:1-7.
24. **Chow VT, Chan YC, Yong R, Lee KM, Lim LK, Chung YK, et al.** Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:578-86. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.58.578>
25. **Seah CL, Chow VT, Chan YC.** Semi-nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. *Clin Diagn Virol*. 1995;4:113-20. [https://doi.org/10.1016/0928-0197\(94\)00063-Z](https://doi.org/10.1016/0928-0197(94)00063-Z)
26. **Hall TA.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999;41:95-8.
27. **Katoh K, Standley DM.** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30:772-80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
28. **Kamgang B, Ngoagouni C, Manirakiza A, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M.** Temporal patterns of abundance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and mitochondrial DNA analysis of *Ae. albopictus* in the Central African Republic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2590. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002590>
29. **Raharimalala FN, Ravaomanarivo LH, Ravelonandro P, Rafaraso LS, Zouache K, Tran-Van V, et al.** Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasit Vectors*. 2012;5:56. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-56>.
30. **Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M, Failloux AB.** Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet Res*. 2005;86:1-11. <https://doi.org/10.1017/S0016672305007627>
31. **Futami K, Valderrama A, Baldi M, Minakawa N, Marín-Rodríguez R, Chaves LF.** New and common haplotypes shape genetic diversity in Asian tiger mosquito populations from Costa Rica and Panamá. *J Econ Entomol*. 2015;108:761-8. <https://doi.org/10.1093/jee/tou028>
32. **Zhong D, Lo E, Hu R, Metzger ME, Cummings R, Bonizzoni M, et al.** Genetic analysis of invasive *Aedes albopictus* populations in Los Angeles County, California and its potential public health impact. *PLoS One*. 2013;8:e68586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068586>
33. **Kampen H, Kronefeld M, Zielke D, Werner D.** Further specimens of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) trapped in southwest Germany. *Parasitol Res*. 2013;112:905-7. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3128-y>
34. **Žitko T, Kovacic A, Desdevises Y, Puizina J.** Genetic variation in East-Adriatic populations of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), inferred from NADH5 and COI sequence variability. *Eur J Entomol*. 2011;108:501-8. <https://doi.org/10.14411/eje.2011.065>
35. **Beebe NW, Ambrose L, Hill LA, Davis JB, Hapgood G, Cooper RD, et al.** Tracing the tiger: Population genetics provides valuable insights into the *Aedes (Stegomyia) albopictus* invasion of the Australasian Region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2361. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002361>
36. **Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980;16:111-20.
37. **Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2725-9. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
38. **Efron B, Halloran E, Holmes S.** Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:7085-90.
39. **Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja-Simon Z, et al.** Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infect Genet Evol*. 2012;12:1260-9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.012>

MATERIAL SUPLEMENTARIO I

Actualización del registro de presencia y distribución del género Adultos colectados *Trichoprosopon* y *Jhonbelkinia*

Código	Sexo	Especies	Morfotipo	Vereda	Municipio	Departamento	Fitotelmata	Tipo de cobertura	Elevación (m)	Latitud	Longitud	Fecha de colecta
RIS009-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Bosque interior	1472,39	5 ° 13 ' 55,11 " N	76 ° 1 ' 46,82 " W	22/01/2012
RIS009-006	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Bosque interior	1472,39	5 ° 13 ' 55,11 " N	76 ° 1 ' 46,82 " W	22/01/2012
RIS009-008	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Bosque interior	1472,39	5 ° 13 ' 55,11 " N	76 ° 1 ' 46,82 " W	22/01/2012
RIS009-103	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Bosque interior	1472,39	5 ° 13 ' 55,11 " N	76 ° 1 ' 46,82 " W	22/01/2012
RIS009-104	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Bosque interior	1472,39	5 ° 13 ' 55,11 " N	76 ° 1 ' 46,82 " W	22/01/2012
RIS009-105	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Bosque interior	1473,39	6 ° 13 ' 55,11 " N	77 ° 1 ' 46,82 " W	22/01/2012
RIS009-107	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Bosque interior	1472,39	5 ° 13 ' 55,11 " N	76 ° 1 ' 46,82 " W	22/01/2012
RIS011-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,38	5 ° 13 ' 55,2 " N	76 ° 1 ' 46,09 " W	22/01/2012
RIS011-100	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,38	5 ° 13 ' 55,2 " N	76 ° 1 ' 46,09 " W	22/01/2012
RIS011-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,38	5 ° 13 ' 55,2 " N	76 ° 1 ' 46,09 " W	22/01/2012
RIS011-108	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,38	5 ° 13 ' 55,2 " N	76 ° 1 ' 46,09 " W	22/01/2012
RIS012-210	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1457,79	5 ° 13 ' 55,42 " N	76 ° 1 ' 45,91 " W	22/01/2012
RIS012-220	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1457,79	5 ° 13 ' 55,42 " N	76 ° 1 ' 45,91 " W	22/01/2012
RIS013-029	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-101	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-102	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-103	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-106	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-107	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-108	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-109	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-110	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-111	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-112	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-113	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-114	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-115	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-116	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-118	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-119	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-120	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-121	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-122	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-123	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012
RIS013-124	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	El Indio	Pueblo Rico	Risaralda	Guadua-Tocón	Guadual	1455,57	5 ° 13 ' 55,29 " N	76 ° 1 ' 45,79 " W	20/01/2012

QUI063-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Filandia-[SV]	Filandia	Quindio	TocónGuadua	Potrero	1876	4 ° 40 ' 19,47 " N	75 ° 39 ' 43,62 " W	29/04/2012
QUI063-103	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2_200_Tr_pal_	Filandia-[SV]	Filandia	Quindio	TocónGuadua	Potrero	1876	4 ° 40 ' 19,47 " N	75 ° 39 ' 43,62 " W	29/04/2012
QUI066-132	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-134	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-135	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-137	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-141	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-143	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-145	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-154	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-155	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-158	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-160	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-168	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2_195Tr_pal_	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI066-173	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1518,7	4 ° 23 ' 37,16 " N	75 ° 41 ' 12,37 " w	30/04/2010
QUI070-107	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1206,2	4 ° 24 ' 14,92 " N	75 ° 42 ' 56,53 " W	30/04/2010
QUI070-110	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1206,2	4 ° 24 ' 14,92 " N	75 ° 42 ' 56,53 " W	30/04/2010
QUI070-112	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1206,2	4 ° 24 ' 14,92 " N	75 ° 42 ' 56,53 " W	30/04/2010
QUI070-113	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1206,2	4 ° 24 ' 14,92 " N	75 ° 42 ' 56,53 " W	30/04/2010
QUI070-114	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Cordoba-[SV]	Cordoba	Quindio	TocónGuadua	Guadual	1206,2	4 ° 24 ' 14,92 " N	75 ° 42 ' 56,53 " W	30/04/2010
2JG001-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939,1	5 ° 35 ' 39,9 " N	75 ° 48 ' 35,97 " W	10/03/2010
2JG001-004	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939,1	5 ° 35 ' 39,9 " N	75 ° 48 ' 35,97 " W	10/03/2010
2JG001-006	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939,1	5 ° 35 ' 39,9 " N	75 ° 48 ' 35,97 " W	10/03/2010
2JG001-008	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939,1	5 ° 35 ' 39,9 " N	75 ° 48 ' 35,97 " W	10/03/2010

2JG001-009	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939,1	5 ° 35 ' 39,9 " N	75 ° 48 ' 35,97 " W	10/03/2010
2JG001-010	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939,1	5 ° 35 ' 39,9 " N	75 ° 48 ' 35,97 " W	10/03/2010
2JG001-024	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939,1	5 ° 35 ' 39,9 " N	75 ° 48 ' 35,97 " W	10/03/2010
2JG002-002	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1936,8	5 ° 35 ' 39,7 " N	75 ° 48 ' 36,15 " W	10/03/2010
2JG003-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1941,6	5 ° 35 ' 39,95 " N	75 ° 48 ' 36,18 " W	10/03/2010
2JG003-005	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1941,6	5 ° 35 ' 39,95 " N	75 ° 48 ' 36,18 " W	10/03/2010
2JG003-007	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1941,6	5 ° 35 ' 39,95 " N	75 ° 48 ' 36,18 " W	10/03/2010
2JG006-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1947,5	5 ° 35 ' 39,78 " N	75 ° 48 ' 35,54 " W	10/03/2010
2JG007-005	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1941,1	5 ° 35 ' 39,91 " N	75 ° 48 ' 36,36 " W	10/03/2010
2JG008-003	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1950,7	5 ° 35 ' 40,1 " N	75 ° 48 ' 35,91 " W	10/03/2010
2JG009-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG009-007	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG009-007.	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG009-009	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG009-011	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG009-014	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG009-015	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG009-017	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1992,6	5 ° 35 ' 37,29 " N	75 ° 48 ' 25,47 " W	10/03/2010
2JG010-003	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,8	5 ° 35 ' 37,36 " N	75 ° 48 ' 25,34 " W	11/03/2010
2JG010-005	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,8	5 ° 35 ' 37,36 " N	75 ° 48 ' 25,34 " W	11/03/2010
2JG010-011	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,8	5 ° 35 ' 37,36 " N	75 ° 48 ' 25,34 " W	11/03/2010
2JG010-014..	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,8	5 ° 35 ' 37,36 " N	75 ° 48 ' 25,34 " W	11/03/2010
2JG010-015	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,8	5 ° 35 ' 37,36 " N	75 ° 48 ' 25,34 " W	11/03/2010
2JG010-022	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,8	5 ° 35 ' 37,36 " N	75 ° 48 ' 25,34 " W	11/03/2010

2JG015-004	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6	5 ° 35 ' 5,66 " N	75 ° 47 ' 37,64 " W	11/03/2010
2JG015-005	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6	5 ° 35 ' 5,66 " N	75 ° 47 ' 37,64 " W	11/03/2010
2JG015-010	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6	5 ° 35 ' 5,66 " N	75 ° 47 ' 37,64 " W	11/03/2010
2JG015-012	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6	5 ° 35 ' 5,66 " N	75 ° 47 ' 37,64 " W	11/03/2010
2JG015-014	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6	5 ° 35 ' 5,66 " N	75 ° 47 ' 37,64 " W	11/03/2010
2JG015-015	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6	5 ° 35 ' 5,66 " N	75 ° 47 ' 37,64 " W	11/03/2010
2JG015-016	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6	5 ° 35 ' 5,66 " N	75 ° 47 ' 37,64 " W	11/03/2010
2JG016-004	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2025,2	5 ° 35 ' 5,92 " N	75 ° 47 ' 38,92 " W	11/03/2010
2JG016-006	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2025,2	5 ° 35 ' 5,92 " N	75 ° 47 ' 38,92 " W	11/03/2010
2JG016-012	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2025,2	5 ° 35 ' 5,92 " N	75 ° 47 ' 38,92 " W	11/03/2010
2JG016-018	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2025,2	5 ° 35 ' 5,92 " N	75 ° 47 ' 38,92 " W	11/03/2010
2JG017-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,3	5 ° 35 ' 7,84 " N	75 ° 47 ' 49,75 " W	11/03/2010
2JG017-008	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,3	5 ° 35 ' 7,84 " N	75 ° 47 ' 49,75 " W	11/03/2010
2JG018-006	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-015	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-016	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-017	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-018	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-026	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-030	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-032	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG018-039	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,63	5 35'8.065"N	75 47'49.849"W	11/03/2010
2JG021-005	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,23	5 35'7.561"N	75 47'49.476"W	11/03/2010
2JG021-006	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2015,23	5 35'7.561"N	75 47'49.476"W	11/03/2010

2JG022-005	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2018,01	5 35'7.664"N	75 47'49.526"W	11/03/2010
2JG022-006	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2018,01	5 35'7.664"N	75 47'49.526"W	11/03/2010
2JG022-012	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2018,01	5 35'7.664"N	75 47'49.526"W	11/03/2010
2JG022-017	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2018,01	5 35'7.664"N	75 47'49.526"W	11/03/2010
2JG022-020	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2018,01	5 35'7.664"N	75 47'49.526"W	11/03/2010
2JG022-021	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2018,01	5 35'7.664"N	75 47'49.526"W	11/03/2010
3JG012-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3HFG006-025	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	La Fe	Hispania	Antioquia	Guadua-Entrenudo	Guadual	1042,1	5 ° 45 ' 24,96 " N	75 ° 54 ' 53,35 " W	18/07/2009
3JQG001-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1954,67	5°35'29,568"N	75°48'23,713"W	19/07/2008
3JQG001-003	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1954,67	5°35'29,568"N	75°48'23,713"W	19/07/2008
3JQG002-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1944,44	5°35'29.641"N	75°48'23.580"W	19/07/2008
3JQG002-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1944,44	5°35'29.641"N	75°48'23.580"W	19/07/2008
3JQG002-007	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1944,44	5°35'29.641"N	75°48'23.580"W	19/07/2008
3JQG002-008	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1944,44	5°35'29.641"N	75°48'23.580"W	19/07/2008
3JQG003-002	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-006	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-010	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-011	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-013	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-014	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-017	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-018	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-020	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG003-027	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008

3JQG003-028	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1949,36	5°35'29.625"N	75°48'23.550"W	19/07/2008
3JQG004-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,88	5°35'27.171"N	75°48'13.185"W	19/07/2008
3JQG004-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,88	5°35'27.171"N	75°48'13.185"W	19/07/2008
3JQG004-005	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1985,88	5°35'27.171"N	75°48'13.185"W	19/07/2008
3JQG007-045	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2024,47	5°34'58.042"N	75°47'37.430"W	19/07/2008
3JQG007-046	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2024,47	5°34'58.042"N	75°47'37.430"W	19/07/2008
3JQG007-048	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2024,47	5°34'58.042"N	75°47'37.430"W	19/07/2008
3JQG007-051	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2024,47	5°34'58.042"N	75°47'37.430"W	19/07/2008
3JQG007-053	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2024,47	5°34'58.042"N	75°47'37.430"W	19/07/2008
5JQGB006-002	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	2419,72	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 46 ' 6,13 " W	N/A
6JQGB006-030	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	2419,72	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 46 ' 6,13 " W	N/A
6JQGB006-031	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	2419,72	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 46 ' 6,13 " W	N/A
6JQGB006-036	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	2419,72	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 46 ' 6,13 " W	N/A
ANT011-100	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-101	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-102	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-104	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-105	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-106	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-107	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-108	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-109	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-110	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-112	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-113	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010

ANT011-145	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-146	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT011-147	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT012-004	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT012-005	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT012-100	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT012-106	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT012-106.	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	fruto de cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-001	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-002	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-003	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-004	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-005	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-006	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-100	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-103	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-104	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-105	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-107	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-109	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-112	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT013-113	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guasimal Alicante	Puerto Berrio	Antioquia	Fruto en suelo- Cacao	Cultivo-Caucho	506,72	6 ° 33 ' 2,86 " N	74 ° 34 ' 8,48 " W	9/10/2010
ANT071-100	M	<i>Trichoprosopon</i> sp. n.e	morfo Jericó	Casco urbano	Jericó	Antioquia	Xanthosoma	Canal o dique	2001,99	5 ° 47 ' 18,3 ' N	75 ° 47 " 26,14 ' W	4/01/2011
ANT071-101	H	<i>Trichoprosopon</i> sp. n.e	morfo Jericó	Casco urbano	Jericó	Antioquia	Xanthosoma	Canal o dique	2001,99	5 ° 47 ' 18,3 ' N	75 ° 47 " 26,14 ' W	4/01/2011

ANT071-103	H	<i>Trichoprosopon</i> sp. n.e	morfo Jericó	Casco urbano	Jericó	Antioquia	Xanthosoma	Canal o dique	2001,99	5 ° 47 ' 18,3 ' N	75 ° 47 " 26,14 ' W	4/01/2011
ANT073-127	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Casco urbano	Jericó	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1969,64	5 ° 47 ' 10,34 ' N	75 ° 47 " 22 ' W	4/01/2012
ANT076-101	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Casco urbano	Jericó	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2018	5 ° 47 ' 37,49 ' N	75 ° 47 " 5,71 ' W	4/01/2011
ANT077-104	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Casco urbano	Jericó	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2044	5 ° 47 ' 36,61 ' N	75 ° 47 " 5,61 ' W	4/01/2011
ANT121-101	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Cedros	La Pintada	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	781,66	5 ° 42 ' 54,55 " N	75 ° 37 ' 16,29 " W	6/02/2012
ANT148-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Travesias	Fredonia	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1640	5 ° 56 ' 57,4 " N	75 ° 39 ' 43,4 " W	25/02/2012
ANT159-105	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	El Plan	Fredonia?	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	619	5 ° 56 ' 9,4 " N	75 ° 39 ' 51,9 " W	26/02/2012
ANT-160-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	N/A	N/A	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1338	5 ° 58 ' 15,4 " N	75 ° 46 ' 19 " W	27/02/2012
ANT160-109	M	<i>Tr. pallidiventer</i> complex	sin definir	N/A	N/A	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1338	5 ° 58 ' 15,4 " N	75 ° 46 ' 19 " W	27/02/2012
ANT164-001	M	<i>Tr. evansae</i>	N/A	Bosque Reserva La playa	Jardín	Antioquia	Xanthosoma	Bosque (borde)	2413	5 ° 35 ' 5,3 " N	75 ° 46 ' 3 " W	28/02/2012
ANT183-002	M	<i>Tr. pallidiventer</i> complex	sin definir	Morro Amarillo	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1918	5 ° 37 ' 3,6 " N	75 ° 50 ' 33,3 " W	1/03/2012
ANS018-106	M	<i>Johnbelkinia</i> sp.	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	848	5 ° 10 ' 34,7 " N	75 ° 40 ' 52,1 " W	18/11/2012
ANT207-017	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Tulenapa	Carepa	Antioquia	Búsqueda activa--	Bosque (interior)	57	7 ° 46 ' 25,7 " N	76 ° 40 ' 13,6 " W	3/03/2012
ANT207-018	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Tulenapa	Carepa	Antioquia	Búsqueda activa--	Bosque (interior)	57	7 ° 46 ' 25,7 " N	76 ° 40 ' 13,6 " W	3/03/2012
ANT207-019	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Tulenapa	Carepa	Antioquia	Búsqueda activa--	Bosque (interior)	57	7 ° 46 ' 25,7 " N	76 ° 40 ' 13,6 " W	3/03/2012
ANTBERRIO	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BA004-001	H	<i>Johnbelkinia</i> sp.	N/A	Itima	Valparaiso	Antioquia	N/A	Guadual conservado	975	5° 41' 35,58" N	75° 38' 9,96" W	N/A
BA005-001	H	<i>Johnbelkinia</i> sp.	N/A	Itima	Valparaiso	Antioquia	N/A	Guadual conservado	975	5° 41' 35,58" N	75° 38' 9,96" W	N/A
BB001-112	M	<i>Tr. pallidiventer</i> complex	N/A	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Bromelia	Potrero	1855	5 ° 47 ' 52,2 " N	76 ° 3 ' 51,4 " W	N/A
BG001-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-003	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-004	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-005	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-006	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-008	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-009	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-013	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-014	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-015	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-016	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-018	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A

BG001-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-102	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-103	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-104	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-105	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-106	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-107	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-109	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG001-110	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827	5 ° 47 ' 51,8 " N	76 ° 3 ' 45,1 " W	N/A
BG003-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
BG003-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Farallones	Ciudad Bolivar	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
HFG017-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	La Fe	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1040	5 ° 45 ' 24 " N	75 ° 55 ' 9 " W	20/09/2007
HFG017-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	La Fe	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1040	5 ° 45 ' 24 " N	75 ° 55 ' 9 " W	20/09/2007
HFG021-011	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	La Fe	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1050	5 ° 45 ' 24 " N	75 ° 55 ' 9 " W	20/09/2007
HFG025-028	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	La Fe	Hispania	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1040	5 ° 45 ' 24 " N	75 ° 55 ' 9 " W	20/09/2007
JB021-010	H	<i>Tr. evansae</i>	N/A	La selva	Jardín	Antioquia	Jama	Bosque interior	2253	5 ° 36 ' 49,9 " N	75 ° 48 ' 57,8 " W	3/04/2012
JG011-018	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
JG011-019	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
JG011-020	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
JG013-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
JG016-004	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
JG019-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
JLGV030-c	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	La linda	Jardín	Antioquia	Guadua-Tallo en suelo	Guadual	1702	5 ° 36 ' 15 " N	75 ° 49 ' 51,6 " W	25/06/2012
JLGV031-a	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	La linda	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1702	5 ° 35 ' 15 " N	75 ° 49 ' 51,6 " W	25/06/2012
JLGV032-c	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	La linda	Jardín	Antioquia	Otro	Rural-domicilio	1702	5 ° 36 ' 15 " N	75 ° 49 ' 51,6 " W	25/06/2012
JMS001	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS011	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS017	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS024	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS025	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS029	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS030	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS032	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS034	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS035	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS038	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Maceo	Puerto Berrio	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JPS011	H	<i>Tr. evansae</i>	N/A	Bosque "La playa"	Jardín	Antioquia	N/A	Bosque	2376	5°35'3,8"N	75°46'5,4"W	13/08/2011
JQG010-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	N/A	1840	5 ° 35 ' 24 " N	75 ° 48 ' 12 " W	N/A

JQG013-005	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1840	5 ° 35 ' 34 " N	75 ° 48 ' 22 " W	12/12/2007
JQG015-004	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1840	5 ° 35 ' 34 " N	75 ° 48 ' 22 " W	12/12/2007
JQGV001-100	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV001-102	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV001-103	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV002-a	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1394	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV005-007	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV005-100	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV005-102	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV006-103	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV006-a	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV007-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1934	5 ° 35 ' 33,2 " N	75 ° 48 ' 23 " W	23/06/2011
JQGV008-026	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV008-100	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV008-105	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV008-106	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV008-107	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV008-a	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 3,04 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV012-a	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 33,4 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV014-b	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	La selva	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 30,14 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQGV015-b	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Quebrada bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939	5 ° 35 ' 30,4 " N	75 ° 48 ' 24,4 " W	23/06/2011
JQPV012	H	<i>Tr. evansae</i>	N/A	Reserva La playa	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	2403	5 ° 35 ' 3,4 " N	75 ° 46 ' 2,9 " W	24/06/2011
JSV001	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Envigado	Antioquia	N/A	Urbano	1675	6° 9'55.33"N	75°35'7.61"O	N/A
HFG025-P2-F	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	La Fe	Hispania	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1040	5 ° 45 ' 24 " N	75 ° 55 ' 9 " W	20/09/2007
HFG025-018	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	La Fe	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1040	5 ° 45 ' 24 " N	75 ° 55 ' 9 " W	20/09/2007
ANT206-12	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Tulenapa	Carepa	Antioquia	N/A	Bosque (interior)	57	7 ° 46 ' 25,7 " N	76 ° 40 ' 13,6 " W	N/A

ANT207-14	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Tulenapa	Carepa	Antioquia	N/A	Bosque (interior)	57	7 ° 46 ' 25,7 " N	76 ° 40 ' 13,6 " W	3/03/2012
ALICANTE003C-101	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003C-107	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003C-109	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003C-110	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003C-112	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003C-119	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003B-114	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003C-111	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE004-101	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
ALICANTE003C-113	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Hacienda Santa Barbara	Maceo	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	453	6° 32' 55,1" N	74° 38' 19,1" W	N/A
JMS005	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Puerto Berrio	Antioquia	Cáscaras de cacao	Cultivo cacao	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS006	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS004	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
JMS002	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	Antioquia	N/A	N/A	950	6 ° 32 ' 24 " N	74 ° 47 ' 2,4 " W	N/A
ACG015-001	H	<i>Tr. compressum</i>	N/A	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	833	5 ° 10 ' 13 " N	75 ° 40 ' 45 " W	6/04/2008
ACG018-002	H	<i>Tr. compressum</i>	N/A	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	980	5 ° 10 ' 13 " N	75 ° 40 ' 45 " W	6/04/2008
ACG018-003	M	<i>Tr. compressum</i>	N/A	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	980	5 ° 10 ' 13 " N	75 ° 40 ' 45 " W	6/04/2008
ACG018-005	M	<i>Tr. compressum</i>	N/A	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	980	5 ° 10 ' 13 " N	75 ° 40 ' 45 " W	6/04/2008
ACG023-004	H	<i>Tr. digitatum</i>	silver scales	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008

ACG023-005	H	<i>Tr. digitatum</i>	silver scales	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008
ACG023-011	M	<i>Tr. digitatum</i>	silver scales	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008
ACG023-012	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008
ACG023-015	H	<i>Tr. digitatum</i>	silver scales	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008
ACG023-016	H	<i>Tr. digitatum</i>	silver scales	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008
ACG023-017	H	<i>Tr. digitatum</i>	silver scales	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008
ACG023-020	H	<i>Tr. digitatum</i>	silver scales	Anserma-[SV]	ANSERMA	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	834	5 ° 10 ' 20 " N	75 ° 40 ' 39 " W	6/04/2008
CAL013-002	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Chinchiná-[SV]	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1301,1	4 ° 59 ' 23,51 " N	75 ° 35 ' 57,21 " W	10/10/2009
CAL013-101	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Chinchiná-[SV]	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1301,1	4 ° 59 ' 23,51 " N	75 ° 35 ' 57,21 " W	10/10/2009
CAL013-102	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Chinchiná-[SV]	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1301,1	4 ° 59 ' 23,51 " N	75 ° 35 ' 57,21 " W	10/10/2009
CAL023-102	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Chinchiná-[SV]	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1301,1	4 ° 59 ' 23,51 " N	75 ° 35 ' 57,21 " W	10/10/2009
CAL024-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Manizales-[SV]	Manizales	Caldas	Guadua-Entrenudo	Pastizal	1910	5 ° 5 ' 34,71 " N	75 ° 32 ' 23,66 " W	11/10/2009
CAL024-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Manizales-[SV]	Manizales	Caldas	Guadua-Entrenudo	Pastizal	1910	5 ° 5 ' 34,71 " N	75 ° 32 ' 23,66 " W	11/10/2009
CAL025-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Manizales-[SV]	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Potrero	1910	5 ° 5 ' 34,7 " N	75 ° 32 ' 23,66 " W	11/10/2009
CAL026-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Manizales-[SV]	Manizales	Caldas	Guadua-Entrenudo	Guadual	1910	5 ° 5 ' 34,7 " N	75 ° 32 ' 23,66 " W	11/10/2009
CAL026-100	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Manizales-[SV]	Manizales	Caldas	Guadua-Entrenudo	Guadual	1910	5 ° 5 ' 34,7 " N	75 ° 32 ' 23,66 " W	11/10/2009
CAL026-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	Manizales-[SV]	Manizales	Caldas	Guadua-Entrenudo	Guadual	1910	5 ° 5 ' 34,7 " N	75 ° 32 ' 23,66 " W	11/10/2009
CAL027-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Planalto	Chinchina	Caldas	Ovitrapa-Guadua--	Guadual	1485	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,76 " W	19/10/2009
CAL028-014	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Planalto	Chinchina	Caldas	Ovitrapa-Guadua--	Guadual	1845	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,76 " W	19/10/2009
CAL031-002	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1845	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,76 " W	19/10/2009
CAL031-003	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1845	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,76 " W	19/10/2009
CAL031-004	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1845	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,76 " W	19/10/2009
CAL031-104	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1845	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,76 " W	19/10/2009
CAL031-105	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1845	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,76 " W	19/10/2009
CAL032-005	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1485	4 ° 59 ' 28,95 " N	75 ° 35 ' 23,7 " W	19/10/2009
CAL033-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Manizales-[SV]	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	N/A

CAL046-137	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	789	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 58,84 " W	19/10/2009
CAL046-139	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Plan alto	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	789	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 58,84 " W	19/10/2009
CAL047-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL047-002	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL047-003	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL047-004	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL047-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL047-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL050-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	842,7	5 ° 10 ' 23,94 " N	75 ° 40 ' 8 " W	N/A
CAL050-004	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	842,7	5 ° 10 ' 23,94 " N	75 ° 40 ' 8 " W	N/A
CAL051-100	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	842,5	5 ° 10 ' 23,94 " N	75 ° 40 ' 8 " W	N/A
CAL051-101	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	842,5	5 ° 10 ' 23,94 " N	75 ° 40 ' 8 " W	N/A
CAL051-102	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	842,5	5 ° 10 ' 23,94 " N	75 ° 40 ' 8 " W	N/A
CAL053-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL053-100	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL053-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL055-002	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL055-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL055-108	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL056-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL056-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL056-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9	5 ° 10 ' 50,76 " N	75 ° 40 ' 56,84 " W	N/A
CAL102-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	832,46	5 ° 10 ' 42,08 " N	75 ° 40 ' 43,55 " W	25/10/2010
CAL110-002	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tallo en suelo	Guadual	817,1	5 ° 10 ' 44,34 " N	75 ° 40 ' 39,44 " W	25/10/2010

CAL116-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	851,54	5 ° 10 ' 33,45 " N	75 ° 40 ' 53,56 " W	26/10/2010
CAL119-117	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tallo en suelo	Guadual	832,16	5 ° 10 ' 39,78 " N	75 ° 40 ' 57,84 " W	26/10/2010
CAL122-103	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Anserma-[SV]	Anserma	Caldas	Guadua-Tallo perforado	Guadual	833,18	5 ° 10 ' 40,28 " N	75 ° 40 ' 37,68 " W	26/10/2010
ANS001-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-tallo en suelo	Guadual	860	5°10'34,71"N	75°40'52,49"W	17/11/2011
ANS018-100	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	848	5 ° 10 ' 34,7 " N	75 ° 40 ' 52,1 " W	18/11/2012
ANS018-101	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	848	5 ° 10 ' 34,7 " N	75 ° 40 ' 52,1 " W	18/11/2012
ANS005-102	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	N/A	Anserma	Caldas	N/A	N/A	860	5°10'34,71"N	75°40'52,49"W	17/11/2011
ANS013-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	N/A	Anserma	Caldas	N/A	N/A	860	5°10'34,71"N	75°40'52,49"W	17/11/2011
ANS013-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	N/A	Anserma	Caldas	N/A	N/A	860	5°10'34,71"N	75°40'52,49"W	17/11/2011
ANT203-100	M	<i>Johnbelkinia ulopus</i>	N/A	Tulenapa	Carepa	Antioquia	Araceae	Bosque (interior)	57	7 ° 46 ' 25,7 " N	76 ° 40 ' 13,6 " W	3/03/2012
ANS018-102	M	<i>Tr. compressum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	848	5 ° 10 ' 34,7 " N	75 ° 40 ' 52,1 " W	18/11/2012
AGI610-104	M	<i>Tr. pallidiventer</i> complex	sin definir	N/A	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15	5 ° 13 ' 41,98 " N	75 ° 46 ' 39,16 " W	5/04/2012
ANS018-080	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	848	5 ° 10 ' 34,7 " N	75 ° 40 ' 52,1 " W	18/11/2012
ANS018-075	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	848	5 ° 10 ' 34,7 " N	75 ° 40 ' 52,1 " W	18/11/2012
ACG018-014	M	<i>Tr. compressum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	980	5°10'13"N	75°40'45"W	N/A
ACG015-006	H	<i>Tr. compressum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	833	5 ° 10 ' 13 " N	75 ° 40 ' 45 " W	N/A
ACG015-005	H	<i>Tr. compressum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	833	5 ° 10 ' 13 " N	75 ° 40 ' 45 " W	N/A
ACG015-001	H	<i>Tr. compressum</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	833	5 ° 10 ' 13 " N	75 ° 40 ' 45 " W	N/A
CGI3124-13	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320,72	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	N/A
CGI3124-12	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Chinchina	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320,72	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	N/A
CAL042-142	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL042-135	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL042-136	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL044-005	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL044-003	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL042-133	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL042-140	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL044-006	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
CAL042-134	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	19/10/2009
VAL008-001	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1184,9	4 ° 42 ' 2,77 " N	75 ° 47 ' 35,79 " W	26/04/2010
VAL008-101	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1184,9	4 ° 42 ' 2,77 " N	75 ° 47 ' 35,79 " W	26/04/2010
VAL013	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL0131	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010

VAL013-001	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-002	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-003	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-004	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-005	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-006	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-008	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-100	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-101	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-102	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-103	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-104	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL013-105	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tallo en suelo	Pastizal	1200,1	4 ° 42 ' 1,74 " N	75 ° 47 ' 37,77 " W	26/04/2010
VAL020-106	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1189,76	4 ° 42 ' 11,79 " N	75 ° 48 ' 1,87 " W	26/04/2012
VAL020-109	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1189,76	4 ° 42 ' 11,79 " N	75 ° 48 ' 1,87 " W	26/04/2012
VAL022-102	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1186,8	4 ° 42 ' 10,6 " N	75 ° 48 ' 1,13 " W	28/04/2010
VAL022-103	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1186,8	4 ° 42 ' 10,6 " N	75 ° 48 ' 1,13 " W	28/04/2010
VAL024-100	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1180	4 ° 42 ' 12 " N	75 ° 48 ' 2,19 " W	1/05/2010
VAL024-101	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.2	Los Ángeles	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1180	4 ° 42 ' 12 " N	75 ° 48 ' 2,19 " W	1/05/2010
R2N031-103	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guachalito	Nuqui	Chocó	Cocos caídos	Palmas de coco y cultivos de yuca	17	5° 37' 42,9" N	77° 24, 25,9"W	13/07/2015
R2N031-102	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guachalito	Nuqui	Chocó	Cocos caídos	Palmas de coco y cultivos de yuca	17	5° 37' 42,9" N	77° 24, 25,9"W	13/07/2015
R1Nuqui10-110	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Guachalito	Nuqui	Chocó	Cocos caídos	Jardín en hotel	17	+5.6293450	-77.4058590	6/04/2015
R1Nuqui10-127	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Jardín en hotel	17	+5.6293450	-77.4058590	6/04/2015
R1Nuqui10-115	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Jardín en hotel	17	+5.6293450	-77.4058590	6/04/2015
R1Nuqui10-127	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Jardín en hotel	17	+5.6293450	-77.4058590	6/04/2015
R1Nuqui10-117	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Jardín en hotel	17	+5.6293450	-77.4058590	6/04/2015

R1Nuqui10-124	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Jardín en hotel	17	+5.6293450	-77.4058590	6/04/2015
R1Nuqui10-124	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MAG033-100	M	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-101	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-102	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-103	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-104	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-105	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-106	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-107	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-108	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-109	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-110	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
MAG033-118	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014

				Nacional Tayrona								
MAG033-119	H	<i>Tr. digitatum</i>	N/A	Mendiwaka, Parque Nacional Tayrona	Santa Marta	Magdalena	Coco caído	Borde Manglar / palmas de coco	26	11° 16' 27,7" N	73° 51' 43,7" W	17/04/2014
2JG016-030	H	<i>Trichoprosopon</i> sp.	N/A	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Bosque de guadua	2025,2	05°35'06"N	75°47'39"W	3/11/2009
2JG020-014	M	<i>Trichoprosopon</i> sp.	N/A	Quebrada Bonita	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Bosque de guadua	2025,2	05°35'06"N	75°47'39"W	3/11/2009
JER006-006	H	<i>Trichoprosopon</i> sp.	N/A	Jardín Botánico los Balsos	Jericó	Antioquia	Guadua-Tocón	Bosque de guadua	2044	05°47'41"N	75°47'06"W	14/09/2016
ITG005-019	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Itagui	Antioquia	Guadua-Tocón	Urbano	N/A	06°09'58"N	75°28'40"W	N/A
ITG005-055	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Itagui	Antioquia	Guadua-Tocón	Urbano	N/A	06°09'58"N	75°28'40"W	N/A
SABD009-100	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Sabaneta	Antioquia	Guadua-Tocón	Urbano	N/A	06°09'02"N	75°36'43"W	N/A
CBI218-014	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	175Tr_pal_	Plan alto	Chinchiná	Caldas	Guadua-Tocón	Bosque interior	1514,53	4 ° 59 ' 29,96 " N	75 ° 35 ' 18,46 " W	2/04/2012
CGI118-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1 176Tr_pal_	N/A	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320,72	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	2/04/2012
JGI19-010	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	Jardín	Antioquia	N/A	N/A	1752	5°36'3,5"N	75°49'2,8"W	4/03/2012
JGI113-010	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	N/A	N/A	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Cultivo de café	1751	5 ° 36 ' 4,59 " N	75 ° 49 ' 9,58 " W	3/04/2012
AGI6110-104	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15	5 ° 13 ' 41,98 " N	75 ° 46 ' 39,16 " W	5/04/2012
CGI114-004	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	Pal.1	N/A	N/A	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320	4 ° 59 ' 24,03 " N	75 ° 35 ' 57,55 " W	N/A
AGI6110-017	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	N/A	N/A	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15	5 ° 13 ' 41,98 " N	75 ° 46 ' 39,16 " W	5/04/2012
HCI021-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	180Tr_pal_	N/A	Hispania	Antioquia	N/A	Cultivo de café	1530	5°46'25,43"N	75°56'19,55"W	N/A
AGI518-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	172Tr_pal_	N/A	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15	5°13'41,98"N	75°46'39,16"W	N/A
AGI413-003	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	173Tr_pal_	N/A	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1582	5°13'43,28"N	75°43'39,08"W	N/A
CGI118-001	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	178Tr_pal_	Plan alto	Chinchiná	Caldas	Guadua	Guadual	N/A	4°59'24,03"N	75°35'57,55"W	N/A
HCI011-002	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	179Tr_pal_	N/A	Hispania	Antioquia	Jama	Cultivo de café	1530	5°46'25,43"N	75°56'19,55"W	N/A
CGI3129-010	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	palpos cortos?	N/A	Chinchiná	Caldas	N/A	N/A	1485	4°59'28,95"N	75°35'23,76"W	N/A
CGI3129-004	H	<i>Tr. pallidiventer</i>	palpos cortos?	N/A	Chinchiná	Caldas	N/A	N/A	1485	4°59'28,95"N	75°35'23,76"W	N/A
OVITG022	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	N/A	CENICAFE	Chinchiná	Caldas	Ovitrapa-Guadua--	Guadual	1284	4°59'25,15"N	75°35'57,83"O	10/09/2011
OVITG018	M	<i>Tr. pallidiventer</i>	N/A	CENICAFE	Chinchiná	Caldas	Ovitrapa-Guadua--	Guadual	1284	4°59'25,15"N	75°35'57,83"O	10/09/2011
JB021-012	H	<i>Johnbelkinia leucopus</i>	N/A	La Selva	Jardín	Antioquia	Jama	Bosque	2253	5 ° 36 ' 49,9 " N	75 ° 48 ' 57,8 " W	N/A
HB021-001	H	<i>Johnbelkinia ulopus</i>	N/A	N/A	Hispania	Antioquia	Jama	Bosque	1412	5 ° 46 ' 26,9 " N	75 ° 56 ' 3,6 " W	6/04/2012
HB031-008	H	<i>Johnbelkinia ulopus</i>	N/A	N/A	Hispania	Antioquia	Jama	Bosque	1412	5 ° 46 ' 26,9 " N	75 ° 56 ' 3,6 " W	6/04/2012
ANT056-001	M	<i>Howardina</i> sp.	N/A	Peñoles	Belmira	Antioquia	N/A	N/A	2881	6 ° 42 ' 50,79 " N	75 ° 42 ' 33,5 " W	N/A

MATERIAL SUPLEMENTARIO II

Especímenes recolectados y usados en el procesamiento molecular.

Especie	Municipio	Dpto	Fitotelmata	Tipo de cobertura	Elevación (msnm)
<i>Jhonbelkinia leocopus</i>	Jardín	Antioquia	n. d.	Bosque	2253
<i>Jhonbelkinia sp.</i>	Quimbaya	Quindío	Guadua caída	Guadual	1117
<i>Jhonbelkinia sp.</i>	Quimbaya	Quindío	Guadua caída	Guadual	1125
<i>Jhonbelkinia sp.</i>	Quimbaya	Quindío	Guadua caída	Guadual	1125
<i>Jhonbelkinia sp.</i>	Quimbaya	Quindío	Guadua caída	Guadual	1125
<i>Jhonbelkinia ulopus</i>	Acandí	Chocó	n. d.	Bosque interior	8
<i>Jhonbelkinia ulopus</i>	Hispania	Antioquia	n. d.	Bosque	1412
<i>Jhonbelkinia ulopus</i>	Hispania	Antioquia	n. d.	Bosque	1412
<i>Trichoprosopon digitatum</i>	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	848
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Anserma	Caldas	Guadua-tallo en suelo	Guadual	860
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1582
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	798,9
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	842,5
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Anserma	Caldas	Guadua-Tocón		842,5
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Chinchiná	Caldas	Guadua	Guadual	1284
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Chinchiná	Caldas	Guadua	Guadual	1284
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Chinchiná	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Chinchiná	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Chinchiná	Caldas	n. d.	n. d.	1485
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Chinchiná	Caldas	n. d.	n. d.	1485

<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Chinchiná	Caldas	Guadua	Guadual	n. d.
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Córdoba	Quindío	Guadua-Tocón	Guadual	1518,7
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Hispania	Antioquia	n. d.	Cultivo de café	1530
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Hispania	Antioquia	n. d.	Cultivo de café	1530
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1316
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>		Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1338
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Venecia	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1388
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.l</i>	Venecia	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1388
<i>Trichoprosopon pallidiventer s.s</i>	Alcalá	Valle del Cauca	Guadua-Tocón	Guadual	1180
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Anserma	Caldas	Guadua	Guadual	1558,15
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Anserma	Caldas	Guadua-Entrenudo	Guadual	1558,15
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Chinchiná	Caldas	Guadua-Tocón	Bosque interior	1514,53
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Ciudad Bolívar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Ciudad Bolívar	Antioquia	Guadua-Tocón	Potrero	1827
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Fredonia	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1640
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Fredonia	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1640
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Itagüí	Antioquia	Guadua-Tocón	Casco urbano	n. d.
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Itagüí	Antioquia	Guadua-Tocón	Casco urbano	n. d.
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Itagüí	Antioquia	Guadua-Tocón	Casco urbano	n. d.
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jardín	Antioquia	Guadua-Tallo en suelo	Guadual	1702
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1702

<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1939
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jardín	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	2032,6
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jardín	Antioquia			2403
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jericó	Antioquia	Guadua-Tocón	Guadual	1969,64
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Jericó	Antioquia	Guadua-Tocón	Casco urbano	2044
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Manizales	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320,72
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Salento	Quindío	Guadua-Tocón	Guadual	2515
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Salento	Quindío	Guadua-Tocón	Guadual	2515
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Salento	Quindío	Guadua-Tocón	Guadual	2515
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Salento	Quindío	Guadua-Tocón	Guadual	2515
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Salento	Quindío	Guadua-Tocón	Guadual	2515
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	Salento	Quindío	Guadua-Tocón	Guadual	2515
<i>Trichoprosopon sp. n.e A</i>	n. d.	Caldas	Guadua-Tocón	Guadual	1320
<i>Trichoprosopon sp. n.e B</i>	Jardín	Antioquia	n. d.	Bosque	2253
<i>Trichoprosopon sp. n.e B</i>	Jardín	Antioquia	n. d.	Bosque	2253
<i>Trichoprosopon sp. n.e B</i>	Jericó	Antioquia	Xanthosoma	Canal o dique	2001,99

MATERIAL SUPLEMENTARIO III

Actualización de la información sobre registros de la presencia de *Anopheles* (*Kerteszia*) spp en Colombia

Información molecular disponible	Especie	Departamento	Localidad	Latitud	Longitud	Referencia	Observaciones
No	<i>Anopheles bambusicolus</i>	Caquetá	El Paujil, San Vicente del Caguán			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles bambusicolus</i>	Meta	Restrepo, Villavicencio			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles bambusicolus</i>	Meta	La Unión			Komp, 1937	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Meta	Villavicencio			Bates, 1944	Corregido a <i>Anopheles lepidotus</i>
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Caldas	Manizales (MUSENUV)			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Cauca	López de Micay, Santa Rosa			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Chocó	Condoto, Itsmína, Quibdó			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Cundinamarca	Medina, Pandi, Ospina Pérez			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Huila	Colombia, Neiva, Palermo, Tello			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Meta	Acacís, Restrepo, Villavicencio			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Nariño	El Tampo, Tumaco			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles boliviensis</i>	Tolima	Cunday, Dolores, Icononzo, Prado, Villarrica			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles cruzii</i>					Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU) (2019) Systematic catalog of Culicidae, http://www.mosquitocatalog.org/species/species_profile.asp?ID=3425 (Accessed 27 March 2019).	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 37' 59" N	75° 49' 48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 37' 59" N	75° 49' 48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 37' 59" N	75° 49' 48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
Si	<i>Anopheles</i> grupo <i>boliviensis</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Meta	Restrepo			Komp, 1937	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Boyacá	Cubará, Otanche			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Cauca	Balboa, Timbiquí			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Chocó	Itsmína (MUSENUV), Pizarro			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Cundinamarca	Ubalá			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Meta	Restrepo, Villavicencio			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles homunculus</i>	Norte de Santander	Arboledas, Chinácota, Salazar			González R. & Soraya N., 2009	

No	<i>Anopheles homunculus</i>	Tolima	Villarrica			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Caquetá				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Magdalena				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Caquetá	Florencia - El Diamante			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Magdalena	Santa Marta - Ciudad Perdida			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Choapal			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Los Alpes			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Las Palmeras			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - Periquito			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina - San Miguel			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Alto de Icononzo			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Dos Quebradas			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Guamitos			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Guatimbol			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - La Fila			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - La Laja			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Naranjal			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Parroquia Vieja			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - San José			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Icononzo - Valencia			Quiñones et al., 1984	Corregido a <i>Anopheles pholidotus</i> (Escobar et al. 2010)
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Caquetá	Florencia			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Cundinamarca	Medina, Paratebueno			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Norte de Santander	Sardinita			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Magdalena	Santa Marta			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Meta	Restrepo			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Tolima	Cunday (MUSENUV), Dolores, Iconozo (MUSENUV), Prado, Purificación (MUSENUV), Villarrica (MUSENUV)			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles lepidotus</i>	Valle del Cauca	Cali (MUSENUV)			González R. & Soraya N., 2009	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Acandí	8° 34' 39.81" N	77° 23' 56.31" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Acandí	8° 34' 39.81" N	77° 23' 56.31" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 21' 40.81" N	77° 21' 23.89" W	GSM	

Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 21' 41.01" N	77° 21' 18.8" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 21' 20.31" N	77° 21' 77.48" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 50' 37.24" N	77° 10' 38.1" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 41' 19.6" N	77° 17' 3.4" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 41' 52.4" N	77° 16' 38.4" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 41' 24.1" N	77° 15' 16.7" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Nuquí	5° 42' 43.37" N	77° 16' 2.16" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM

Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.43" N	77° 22' 9.48" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Bahía Solano	6° 20' 47.48" N	77° 22' 9.29" W	GSM	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Litoral de San Juan	4° 16' 14.1" N	77° 29' 34.3" W	GSM	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Nariño	Santa Bárbara - Iscuandé	02° 37' 38.2" N	78° 4' 54.5" W	Escobar, 2014 (Tesis)	
No	<i>Anopheles neivai</i>	-	Costa Pacífica			Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Casanare				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Cundinamarca				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Bolívar				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Caquetá				Olano et al., 2002	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura - La Barra	3° 58' N	77° 23' W	Gutiérrez et al., 2008	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura - Puerto España	4° 2' N	77° 26' W	Gutiérrez et al., 2008	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Charambirá			Astaiza et al., 1988	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Río Raposo; pacífico colombiano			Lee, V. & Sanmartín, C. 1967	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco			Ahumada et al., 2016	
Si	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Tumaco			Ahumada et al., 2016	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Antioquia	Amalfí, Urrao, Yarumal			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Bolívar	Mompós			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Boyacá	Cubará, Otanche, Támara			González R. & Soraya N., 2009	

No	<i>Anopheles neivai</i>	Cauca	Argelia, Balboa, Guapi, López de Micay, Patía, Timbiquí			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Chocó	Condoto, Itmina (MUSENUV), Nóvita, Nuquí, Pizarro, Quibdó (MUSENUV), San José del Palmar, Sipí, Tadó			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Cundinamarca	Pandí, Ubalá, Yacopí			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Nariño	Barbacoas, El Charco (MUSENUV), El Tampo, La Tola, Los Andes, Mosquera, Olaya Herrera, Ricaurte, Samaniego, Santa Bárbara, Santa Cruz, Taminango, Tumaco			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Norte de Santander	Arboledas, Cucutilla, Hacarí, Salazar, Sardinata, Toledo			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Tolima	Icononzo, Purificación, Villarrica			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Valle del Cauca	Buenaventura (MUSENUV)			González R. & Soraya N., 2009	
No	<i>Anopheles neivai</i>	Vaupés	Mitú			González R. & Soraya N., 2009	
	<i>Anopheles neivai</i>						
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Sierra Nevada de Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Sierra Nevada de Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Cunday	04° 47' 59.1" N	74° 34' 50.21" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Icononzo	04° 51' 02.1" N	74° 09' 003" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Villarrica	03° 52' 03.4" N	74° 39' 09.8" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Purificación	03° 51' 58.11" N	74° 55' 59.83" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Tolima	Prado	03° 45' 04.15" N	74° 49' 55.9" W	Escovar <i>et al.</i> , 2014	
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Antioquia	Belmira - Páramo Santa Inés	06° 37' 30" N	75° 42' 25" W	GSM	
Si	<i>Anopheles pholidotus</i>	Antioquia	Jardín - Reserva forestal La Playa	05° 35' 03" N	75° 46' 02" W	GSM	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	
No	<i>Anopheles pholidotus</i>	Magdalena	Santa Marta	11° 5' 48.0" N	74° 4' 33.8" W	GSM	