

Filogenia intraespecífica y variabilidad genética de *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) con los genes mitocondriales ND5 y COI

Intraspecific phylogeny and genetic variability of Culex quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) with mitochondrial genes ND5 and COI

Loriana Quintero & Juan-Carlos Navarro*

RESUMEN

Culex quinquefasciatus Say (Diptera; Culicidae) es un mosquito perteneciente al complejo Pipiens con distribución amplia en el mundo y en Venezuela tanto en zonas urbanas como rurales; es acentuadamente antropofílico y vector de varios virus y parásitos mantenidos en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave. Dicha distribución y ocupación de hábitats larvales de origen antropogénico podría sugerir la presencia de subpoblaciones geográficas que pudieran participar en forma diferencial en la transmisión de patógenos. Los análisis filogenéticos y redes de haplotipos de éste trabajo, con secuencias de los genes mitocondriales (Subunidad I del Citocromo oxidasa y Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa) de poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* colectadas en nueve localidades (cementeros) de Venezuela sugieren alta homogeneidad genética inter-poblacional y una sola entidad filogenética (monofilia). Se demostró que el fragmento del gen COI tiene mayor resolución en la definición de la filogenia de especies cercanas y a nivel de géneros y ajustado con la clasificación actual. El gen ND5 con alta variación es más útil para estudios poblacionales, sin embargo muestra parafilia entre *Cx. corniger* y *Cx. quinquefasciatus*, que representa una evidencia de posible homogenización por entrecruzamiento, introgresión o infección por *Wolbachia*. Las redes de haplotipos sugieren poblaciones en expansión con alta variabilidad haplotípica y heterogeneidad genética intra poblacional y homogeneidad inter poblacional, con implicaciones evolutivas en la dispersión de sus poblaciones y el éxito en áreas urbanas, así como evidencia de posible cuello de botella en poblaciones producto de marcadas campañas de aplicación de insecticidas, información útil en la planificación de futuras estrategias de control sanitario

Palabras clave: ADN mitocondrial, citocromo oxidasa I, monofilia, mosquitos urbanos, ND5, filogenia, parafilia, red de haplotipos.

SUMMARY

Culex quinquefasciatus Say (Diptera, Culicidae) is a mosquito belonging to the Pipiens complex with wide distribution in the world and in Venezuela, both urban and rural. Besides, it is a markedly anthropophilic vector of several viruses and parasites maintained in nature in a cycle enzootic bird-mosquito-bird. The wide distribution and occupation of larval habitats of anthropogenic origin may suggest the presence of geographical subpopulations, which may differentially participate in the transmission of pathogens. Phylogenetic analysis and haplotype networks with sequences of mitochondrial genes (cytochrome oxidase subunit I and subunit 5 of NADH dehydrogenase) of populations collected in nine locations (cemeteries) of Venezuela showed high inter-population genetic homogeneity and a single phylogenetic entity (monophyly). It demonstrated that the COI gene fragment had a higher resolution in the definition of the phylogeny of closely related species and genera level and correlated with the current classification. The ND5 gene variation is highly useful for population studies. However, this gene showed parafly between *Cx. corniger* and *Cx. quinquefasciatus* as an evidence of possible homogenization by inbreeding, introgression or infection with *Wolbachia*. The haplotype networks suggest expanding populations with high haplotype variability and genetic heterogeneity occurred within populations. Moreover, the analysis, showed homogeneity among populations with evolutionary implications in the dispersion of their populations and successful occupation in urban areas, as well as evidence of possible population bottleneck as consequence of insecticide control campaigns.

Key words: Phylogeny, cytochrome oxidase I, haplotypes network, mitochondrial DNA, urban mosquitoes, monophyly, ND5, parafly.

INTRODUCCIÓN

Culex quinquefasciatus Say, junto con otros miembros del complejo *Culex pipiens*, son vectores de algunos arbovirus y nemátodos que afectan al hombre y otros grupos animales (Rivas *et al.*, 1995; Sabatinelli *et al.*, 1994; Weaver *et al.*, 1996). Epidemiológicamente, *Cx. quinquefasciatus* es responsable de la transmisión de filarias como *Dirofilaria immitis* (Lai *et al.*, 2000) y *Wuchereria bancrofti* (Farid *et al.*, 2001), causante de una enfermedad parasitaria llamada Filariasis y también de los virus del Nilo Occidental y Encefalitis de San Luis en Estados Unidos (Lanciotti *et al.*, 2000) y en Europa (Hubalek & Halouzka, 1999), los cuales son mantenidos en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave. Esta especie habita en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, abunda principalmente en América y África tropical, Oriente Medio, sur de Asia, Nueva Guinea, Australia y el sur de Estados Unidos (Brewer *et al.*, 1987; Almirón *et al.*, 1995). En Venezuela, *Cx. quinquefasciatus* se distribuye por casi todo el territorio nacional, en áreas urbanas, suburbanas y rurales (Sutil, 1980) desde el nivel del mar hasta una altitud de 2.327m (Navarro *et al.*, 2010).

Culex quinquefasciatus posee una vagilidad intermedia; tiene un ciclo de vida holometábolo y sus fases inmaduras se desarrollan en depósitos de agua, ocupando diversos tipos de criaderos, con abundante contenido de materia orgánica, detritos en proceso de fermentación, preferentemente sombreados, lénticos o semilóticos, cercanos al ambiente domiciliario y principalmente antropogénicos (Brewer *et al.*, 1987).

La distribución geográfica tan amplia y su gran amplitud de nicho en cuanto a los criaderos que ocupan sus larvas y pupas pueden estar determinados por una variabilidad genética poblacional y sus cambios en pequeñas escalas temporales y grandes escalas espaciales producto de factores ecológicos intrínsecos a la localidad, tales como: la altitud y el clima, o en escalas temporales grandes y espaciales pequeñas tales como: efecto fundador o cuello de botella, flujo genético, el proceso de la deriva genética, vicarianza pueden generar linajes que llegarían a ser divergentes. Adicionalmente, en mosquitos, existen presiones antropogénicas que influyen en la genética de sus poblaciones tales como, la aplicación intensiva de insecticidas o el transporte pasivo de huevos o larvas, los cuales son considerados como procesos ecológicos recientes producto de la actividad humana.

Estos cambios pueden conducir a una estructura filogenética en la cual, los eventos de cladogénesis pueden ser explicados a escala ecológica o evolutiva dependiendo del grado de divergencia nucleotídica y la tasa mutacional propia del taxón (Hoy, 2003).

Una forma de inferir si existen o no dichos cambios génicos, es a través de la filogeografía, o el estudio de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos a nivel intraespecífico mediante el uso de caracteres de ADNmt (Avice *et al.*, 1987), y el uso de análisis filogenéticos intraespecíficos o redes de haplotipos (Clement *et al.*, 2000).

El ADN mitocondrial es una molécula circular covalentemente cerrada, conformada por un total de 37 genes, que tiene un alto grado de polimorfismo y una tasa alta de sustitución de nucleótidos en muchos taxa. La alta tasa de evolución a nivel de secuencias de nucleótidos, su prácticamente nula recombinación, gran variación intraespecífica, y más importante, su herencia estrictamente materna. (Krzywinski & Besansky, 2003) convierten al ADNmt en una molécula particularmente ventajosa para análisis filogeográficos a nivel intrapoblacional.

Debido a que el ADNmt es utilizado extensivamente como un marcador para hacer inferencia acerca de parámetros poblaciones (Avice, 1994) y definir genealogías maternas dentro de especies (Simon *et al.*, 1994) en este estudio se utilizaron secuencias parciales de los genes COI (Citocromo Oxidasa subunidad I) y ND5 (Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa) utilizados en otras especies de mosquitos para caracterizar poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de diferentes localidades de Venezuela asociadas a criaderos de cementerios locales, estimando la estructura filogenética y redes de haplotipos de dichas poblaciones como forma de inferir los factores que pueden estar asociados tanto a la estructura filogenética intraespecífica como a la variabilidad genética y diversidad de haplotipos de las subpoblaciones de *Cx. quinquefasciatus* que pudiesen estar determinando el éxito de esta especie en la ocupación de ambientes urbanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mosquito, colecta, cría e identificación

Se procesó material de nueve cementerios/ localidades de Venezuela (Tabla I), los cuales

Tabla I. Origen geográfico de las poblaciones utilizadas de *Culex quinquefasciatus* muestreadas en Venezuela.

Localidades/Poblaciones	Código Abreviatura	Estado	Coordenadas	Altitud
1.- Cementerio de la Colonia Tovar	(CCT)	Aragua	10° 24' 30.0"N 67° 17' 18.9"W	1.834m
2.- Cementerio General del Sur	(CGS)	Distrito Capital	10°28'46.4"N 66°55'09.2"O	900m
3.- Cementerio del Hatillo	(CH)	Miranda	10°35'26.11"N 66°49'45" W	1.490m
4.- Cementerio Punta Mulatos	(CPM)	Vargas	10°36'15,8"N 66°55'9,2"W	4m
5.- Cementerio Municipal San Juan de los Morros	(CG)	Guárico	09°54'36,75"N 67° 21' 10,42"W	512m
6.- Cementerio Municipal Chichiriviche	(CF)	Falcón	10°55'52,73"N 68°16'17,83"W	15m
7.- Cementerio Municipal Mariño	(CM)	Aragua	10°14'37,85"N 67°36'16,08"W	450m.
8.- Cementerio Municipal de San Félix	(CB)	Bolívar	08°19'53.09" N 62°39'02,18" W	120m
9.- Desagues (Parque del Este)	(PE)	Distrito Capital	10°29'25,1"N 66°50'18.5" W	857m

representan la unidad de muestreo equivalente a localidades geográficas. En cada cementerio se seleccionaron floreros de forma aleatoria considerando los diferentes microhábitats (ej: sombra, sol) y tratando de abarcar el área total del cementerio. El contenido de los floreros fue trasvasado y filtrado para obtener ejemplares vivos que fueron trasladados en bolsas de polietileno Whirl-Pack® al laboratorio. El material vivo fue desarrollado hasta adulto desde larvas y pupas como crías asociadas (Belkin *et al.*, 1967 y Navarro *et al.*, 2007). La serie asociada y el adulto montado fueron almacenados como "voucher" para su verificación morfológica posterior siguiendo el protocolo de Navarro & Weaver (2004). Se incluyó, en la misma forma, para comparación con el grupo de estudio (individuos colectados en floreros) los ejemplares de otro tipo de criaderos (desagües) provenientes de la localidad Parque del Este (Zoológico) en la ciudad de Caracas.

Adicionalmente, se colectaron ejemplares (inmaduros y adultos) bajo el mismo método descrito, de *Culex corniger* (Cementerio General del Sur), junto con *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* (Parque del Este) para ser utilizados como grupos de referencia.

Los adultos y larvas fueron identificados mediante el uso de claves morfológicas tradicionales (Cova García *et al.*, 1966; Lane, 1953). En los individuos adultos, se procedió a extraerle las tres patas del lado derecho las cuales se preservaron en etanol 99% para los análisis moleculares (Navarro & Weaver, 2004; Navarro *et al.*, 2009).

Extracción de ADN, Amplificación de COI y ND5 por PCR y Secuenciación

Se utilizó un total de 150 individuos de *Cx. quinquefasciatus*, 2 individuos de *Aedes aegypti*, 2 de *Aedes albopictus* y 4 individuos de *Cx. corniger*, para la amplificación y secuenciación de los genes del Citocromo oxidasa Subunidad I (COI) y Subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (ND5). Para la extracción individual del ADN genómico de las patas, se siguió el protocolo de Arrivillaga *et al.* (2002).

Se amplificó una región de aproximadamente 556pb dentro de la porción del gen COI entre las posiciones 1632 y 2188 de las especies estudiadas, utilizando los cebadores: C1J1632 (+): 5'- TGATCAAATTTATAAT -3'

Tabla II. Porcentaje de sitios polimórficos, números de haplotipos y valores de diversidad de haplotipos y nucleotídica, estadístico de Hudson (Hst) y prueba de Tajima's D para las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* de cada localidad estudiada para los genes COI y ND5. (Abreviaturas en Tabla I).

COI

Pob.	Nº de individuos	Sitios variables	% de sitios polimórficos	Nº de Haplotipos	Diversidad de haplotipos de subpoblación (Hs)	Estadístico de Hudson (Hst)	Tajima's D
CCT	6	8	1,47	4	0,800	0,100 <i>P</i> : 0,1366	1,73257 <i>P</i> >0.10
CGS	9	4	0,73	5	0,806	0,242 <i>P</i> : 0,6225	0,07803 <i>P</i> >0.10
CH	6	23	4,24	5	0,933	0,005 <i>P</i> : 0,9429	1,23802 <i>P</i> >0.10
CPM	18	25	4,61	10	0,810	0,098 <i>P</i> : 0,7545	0,70146 <i>P</i> >0.10
CG	10	14	2,58	8	0,933	0,037 <i>P</i> : 0,8473	1,55676 <i>P</i> >0.10
CF	9	8	1,47	4	0,694	0,960 <i>P</i> : 0,3273	0,34120 <i>P</i> >0.10
CM	7	4	0,73	2	0,571	0,358 <i>P</i> : 0,1306	2,12595 <i>P</i> <0.05*
CB	8	9	1,66	2	0,850	0,15 <i>P</i> : 0,1435	1,05482 <i>P</i> >0.10
PE	3	2	0,92	2	0,667	0,039 <i>P</i> : 0,8905	No aplica
Total	76	83	15,31	31			
Diversidad de haplotipos total (H _T)	0,8884				*SIGNIFICATIVO		

ND5

Pob.	Nº de individuos	Sitios variables	% de sitios polimórficos	Nº de Haplotipos	Diversidad de haplotipos de subpoblación (Hs)	Estadístico de Hudson (Hst)	Tajima's D
CCT	9	42	9,9	7	0,944	0,008 <i>P</i> : 0,9307	1,90917 <i>P</i> > 0.10
CGS	9	58	13,9	6	0,917	0,01 <i>P</i> : 0,401*	0,08905 <i>P</i> > 0.10
CH	3	33	7,8	4	0,900	0,000 <i>P</i> : 0,9908	1,70930 <i>P</i> > 0.10
CPM	10	27	6,4	7	0,867	0,063 <i>P</i> : 0,302*	1,22910 <i>P</i> > 0.10
CG	8	27	6,4	3	0,607	0,013 <i>P</i> : 0,9097	0,69583 <i>P</i> > 0.10
CF	7	48	11,3	5	0,857	0,97 <i>P</i> : 0,3234	1,03019 <i>P</i> > 0.10
CM	9	24	5,6	6	0,833	0,059 <i>P</i> : 0,8076	1,40430 <i>P</i> > 0.10
CB	8	53	12,5	4	0,643	0,30 <i>P</i> : 0,0203*	1,51639 <i>P</i> > 0.10
PE	2	14	3,3	2	1,000	0,07 <i>P</i> : 0,2437*	No aplica
Total	68	115	27,1	34			
Diversidad de haplotipos total (H _T)	0,924				*SIGNIFICATIVO		

Nº de individuos: Número ejemplares secuenciados; Sitios variables: sitios variantes en el total de individuos/secuencias; % Sitios polimórficos: del total de individuos de la localidad.

(Kambhampati & Smith, 1995) y CIN2191 (-): 5'-GGTAAAATTAATAAATAAACTTC- 3' (Simon *et al.*, 1994). Se utilizó para la amplificación el programa señalado por Kambhampati y Smith (1995). Para el gen ND5 se amplificó una región de aproximadamente de 450pb, utilizando los cebadores: ND5(+): 5'-TCCTTAGAATAAAATCCCGC-3' y ND5(-): 5'-GTTTCTGCTTTAGTTCATTCTCT-3' (Birungi y Mustermann, 2002).

Los productos de amplificación fueron analizados por medio de electroforesis sobre geles de agarosa al 1% en solución Tampón TBE al 10% teñidos con Bromuro de Etidio y utilizando 3 µL de muestra (producto de PCR). Los productos de las amplificaciones positivas fueron purificados siguiendo el protocolo que sugiere el Kit de purificación de ADN – Wizard Genomic (Promega). La secuenciación se realizó en el CeSAAN-IVIC (Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucléicos).

Fueron secuenciados un total de 154 amplicones de los fragmentos de 556pb de ADNmt COI y 450pb de ADNmt ND5, de las cuales se utilizaron 76 secuencias de *Cx. quinquefasciatus* provenientes de las diferentes localidades para el gen COI y 68 para ND5 que resultaron positivos (18 amplicones adicionales se secuenciaron para los grupos de referencia). El número de individuos de *Cx. quinquefasciatus* y las especies de referencia (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. corniger*) utilizados por cada localidad se muestra en la Tabla II. Adicionalmente, se utilizaron 2 secuencias de *Cx. corniger* disponibles en la base de datos GenBank sólo para los análisis correspondientes al gen COI. El bajo número de ejemplares en las especies referencia (*Cx. corniger* y *Aedes*) no tiene influencia en los análisis taxonómicos o poblacionales. Solo se usaron como secuencias de referencia de otros taxa relacionados evolutivamente cercana o lejanamente al grupo de estudio.

Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron revisadas mediante el software Sequencher 4.1 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) con el cual se corrigieron ambigüedades (N) y errores de secuenciación mediante el “Contig” producido entre las secuencias directa y reversa. Las secuencias consenso se

analizaron mediante MacVector ver. 7.2 (Accelrys, Madison, WI) y se realizaron búsquedas en Gen Bank-NCBI utilizando el algoritmo Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificación de identidad de las secuencias. Se realizaron alineamientos múltiples mediante el algoritmo de Thompson *et al.* (1998) empleando el programa Clustal W [en MacVector versión 7.2; Accelrys, Madison, WI]. Las secuencias alineadas fueron introducidas en un archivo GCG (msf) en el programa MacClade 4.0 (Maddison & Maddison) para la edición de la matriz de secuencias. Se utilizó el software DNAsp (Rozas y Rozas, 1999) para determinar los sitios variantes, polimórficos, haplotipos totales y los haplotipos dentro de cada localidad. Se calcularon los siguientes estadísticos *dentro* y *entre* las poblaciones: diversidad nucleotídica estimada sensu Nei (1987), estimación de diferenciación genética entre haplotipos de poblaciones de diferentes localidades calculada por el estadístico Hst (Hudson *et al.*, 1992), Tajima Test “D” para neutralidad utilizando el número total de sitios segregantes (Tajima, 1989).

Se realizaron los análisis filogeográficos bajo el criterio de parsimonia máxima por búsqueda heurística, mediante PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002): se obtuvo los árboles parsimoniosos mediante construcción de árboles de Wagner (1000 réplicas de adición al azar y con recorte y reconexión de ramas-TBR) en búsqueda de islas de árboles. Los caracteres fueron tratados con igual peso, multiestado y en forma desordenada (no aditivos). Los “gaps” fueron tratados como datos perdidos para los análisis. Se realizaron consensos estrictos para sintetizar las soluciones obtenidas.

Se realizó un repesado de caracteres mediante el índice de consistencia recalculado en búsqueda de soluciones más óptimas. Se evaluó el apoyo de grupos con un re-muestreo por Bootstrapping de 500 réplicas (Felsenstein, 1985). Se realizó el cálculo de las matrices de distancia pareadas sin corrección y por Kimura dos parámetros (K2P) (Kimura, 1980). Finalmente, se realizó la prueba de homogeneidad entre hipótesis (Partition Homogeneity Test) por búsqueda heurística y TBR para determinar la concordancia de los datos (COI+ND5) para realizar los análisis de matrices combinadas (Farris *et al.*, 1995).

Debido a la ausencia de estructuración filogenética y formación de clados monofiléticos

apoyados, se realizó el cálculo de red de haplotipos mediante el software TCS (Clement *et al.*, 2000), basado en parsimonia estadística, para obtener una discriminación final de los cambios mutacionales por medio del análisis de patrones espaciales/temporales de variación genética (Templeton, 1998).

RESULTADOS

GEN COI

Longitud de las secuencias y contenido Guanina + Citosina (%G+C)

Las secuencias de *Cx. quinquefasciatus* presentaron una longitud de 542pb, para *Aedes (aegypti y albopictus)* entre 595-602pb, y una longitud de 478pb para *Cx. corniger*. El contenido de G+C en las secuencias de *Cx. quinquefasciatus* estuvo comprendido en un intervalo de 31,3 - 31,8%, similar al porcentaje señalado previamente para otras especies de mosquitos [*Anopheles* 31,4%, *Drosophila* 30,2% (Herbeck & Novembre, 2003), especies de *Culex* de la Sección *Melanoconion* y de la Sección

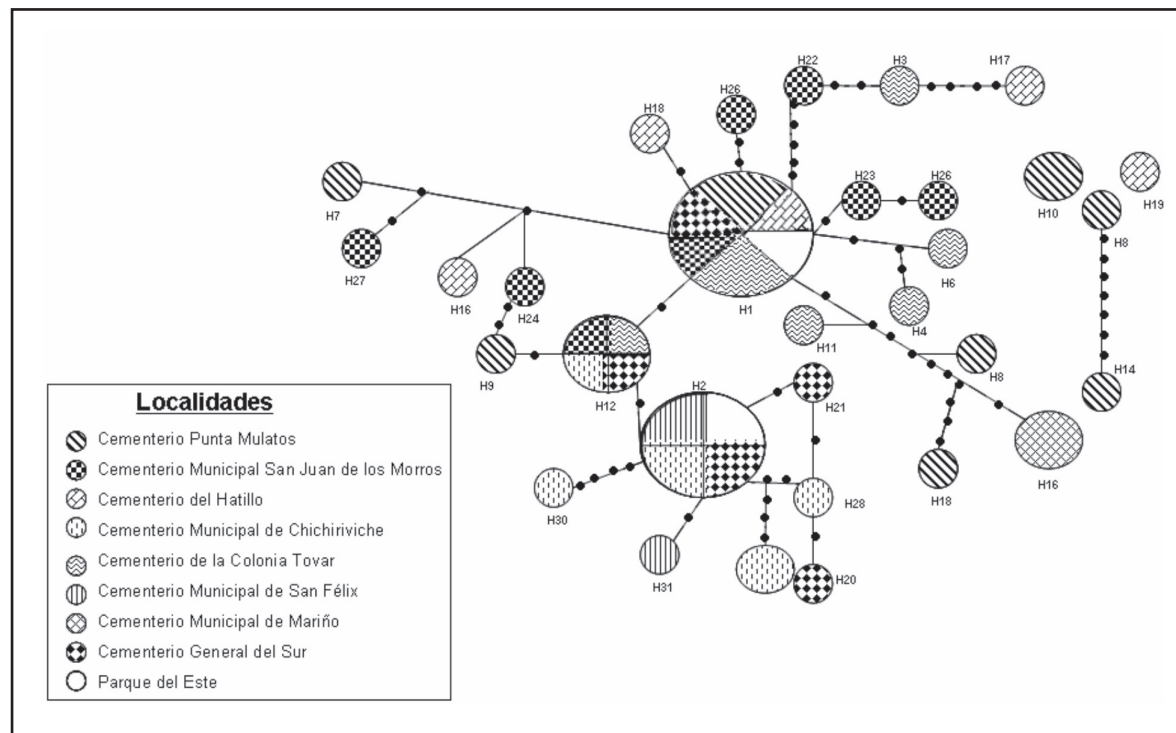
Spissipes del subgénero *Melanoconion* con 30,57 – 35,15% (Hernández, 2005) y 31,9% en especies del subgénero *Nyssorhynchus* de *Anopheles* (Navarro *et al.* 2009)].

Sitios variables o polimorfismo y red de haplotipos

La porción amplificada del gen COI mostró 83 sitios variables definiendo 31 haplotipos (Tabla III) en un total de 76 secuencias de *Cx. quinquefasciatus*. El alineamiento muestra un 15,3% de sitios polimórficos y 13,3% filogenéticamente informativos. Los porcentajes de sitios polimórficos pertenecientes a cada población se muestran en la Tabla II.

La red de haplotipos (Fig. 1), ilustra las relaciones de los 31 haplotipos encontrados, mostrando 3 líneas principales a partir de aquellos mas comunes (ancestrales *sensu* TCS): un primer grupo (haplotipo 1) caracterizado por poblaciones de Colonia Tovar (CCT), Punta Mulato (CPM), El Hatillo (CEH), General del Sur (CGS), Municipal de San Juan de los Morros (SJM) y del Parque del Este (PE); el segundo grupo (haplotipo

Fig. 1. Red mínima de haplotipos en las que se muestran las conexiones entre haplotipos de *Culex quinquefasciatus* obtenidos con el gen mitocondrial COI. Los puntos indican sustituciones de nucleótidos. El número al lado de cada compartimiento corresponde al número del haplotipo y la trama representa la localidad. El tamaño de cada compartimiento es proporcional a la frecuencia de haplotipos en la población.



2), comprende poblaciones de Chichiriviche y Bolívar, así como el CGS y PE; y el tercer grupo (haplotipo 12), presente en las poblaciones del cementerio Municipal Mariño-Maracay (CMM) y en los cementerios de PM, CGS, y SJM.

La Tabla II muestra adicionalmente el número de individuos por subpoblación (localidades), el número de haplotipos encontrados y el cálculo de la diversidad de haplotipos por subpoblación.

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

Diferenciación poblacional: Diversidad de haplotipos y diversidad nucleotídica

La diversidad de haplotipos global para el total de las poblaciones de los diferentes cementerios (sin incluir al grupo externo) fue Ht: 0,8884. La diversidad nucleotídica en el total de las muestras fue Pi (t): 0,01161. Los valores de Hst correspondientes a las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de cada cementerio no fueron estadísticamente significativos, indicando que no existen diferencias significativas entre las poblaciones de cada localidad muestreada. Para el total de las muestras se obtuvo un valor de Tajima negativo D (-2,11291), el cual fue estadísticamente significativo $P < 0.05$; sin embargo los valores de Tajima para cada población fueron muy variables, mostrando valores negativos y no significativos estadísticamente para las poblaciones de cinco localidades, y valores positivos para las poblaciones de tres localidades siendo estadísticamente significativo para la población del cementerio Municipal Mariño 2,12595 ($P < 0.05$).

Distancias genéticas y análisis filogenéticos

Las distancias genéticas, indicaron valores K2P intra-especie entre 0,1 - 2,8% para *Cx. quinquefasciatus*, de 0,55-3% para *Cx. corniger*, de 0% para *Ae. aegypti* y 0,9% para *Ae. albopictus*. Las especies del mismo género mostraron distancias entre 12,44 - 12,89%, tal es el caso de *quinquefasciatus* y

corniger, mientras que entre las especies *aegypti* y *albopictus* del género *Aedes* los valores de distancias genéticas estuvieron entre 14,06 - 14,07%. No obstante la diferencia en el número de ejemplares entre ambos géneros, las distancias son similares a las encontradas entre especies de otros géneros con este mismo gen (datos no publicados). Un total de 53 secuencias provenientes de 4 especies y 542 nucleótidos como caracteres fueron alineadas y usadas en el análisis. Del total de caracteres, 368 fueron constantes, 45 no informativos y 129 informativos para parsimonia. Los análisis con los caracteres tratados con igual peso (Fig. 2) y con caracteres repesados realizados con 1000 réplicas, arrojaron 2808 y 49 árboles o soluciones parsimoniosas, de longitud (L) 263 y 209, Índice de Consistencia (IC)= 0,783 y 0,860, Índice de Retención (IR)= 0,889 y 0,930 respectivamente.

Las topologías en cada análisis (pesos iguales y repesados) y consensos no muestran diferencias en la agrupación interna del grupo en estudio. El árbol de remuestreo (bootstrapping) exhibe el Clado A agrupando el género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*) con 95% de apoyo, el Clado B con secuencias de *Culex corniger* y el Clado C, representado por secuencias de *Cx. quinquefasciatus*, éstos dos últimos con 100% de apoyo. El clado *quinquefasciatus* politómico (clados no resueltos), muestra algunos subclados con bajo apoyo como C3 con 55% y C7 con 61% con la excepción del subclado C8 con un apoyo de 77% que no guardan relación geográfica alguna (las secuencias de estos subclados pertenecen a diferentes localidades en forma parafillética).

GEN ND5

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

Las secuencias presentaron una longitud 425pb para *Cx. quinquefasciatus*, de 453-460pb para los *Cx. corniger* y 453pb para los *Aedes*. El porcentaje de G+C de las secuencias obtenidas estuvo comprendido en un intervalo de 23,9-24,5%. Estos valores son similares a los obtenidos en *Anopheles (Kerteszia) spp* (datos no publicados), sin embargo no existe información al respecto para los géneros *Culex* ni *Aedes*.

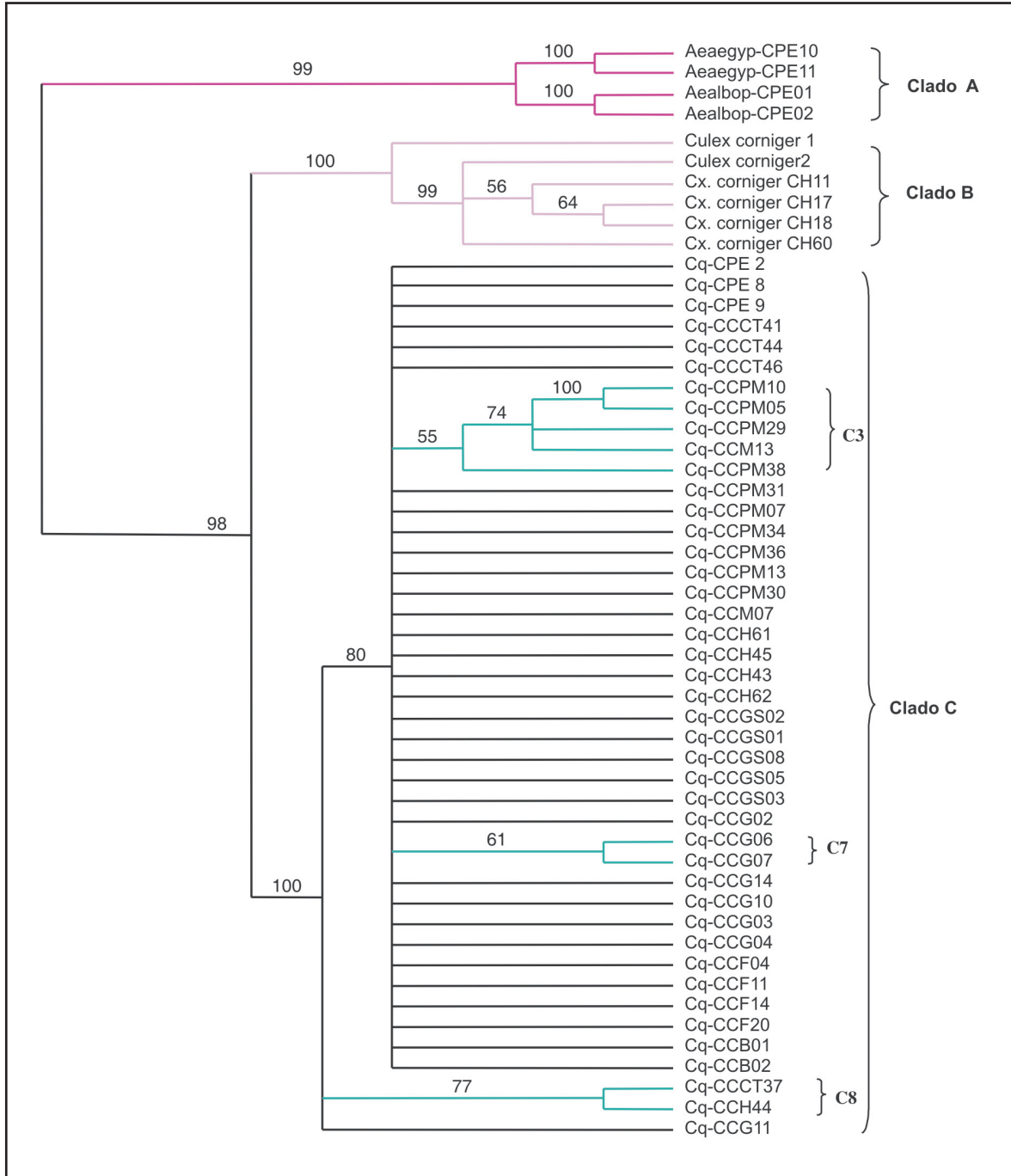
Sitios variables o polimorfismo y red de haplotipos obtenidos

El alineamiento de 68 secuencias de *Cx. quinquefasciatus* muestra que 27,06% de los sitios

Tabla III. Frecuencia de haplotipos para el gen COI, encontrados en un total de 76 individuos de *Culex quinquefasciatus* recolectados en los diferentes cementerios y/o localidades estudiadas. (Frecuencia= N° de Individuos x haplotipo / N° individuos totales).

Hapl	Poblaciones	N° de Individuos	Códigos (identificación-voucher) de las muestras	Frecuencia (%)
H1	Parque del Este Cementerio de la Colonia Tovar Cementerio General del Sur Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal de San Juan de los Morros Cementerio del Hatillo	18	CqPE2 Cq-PE9 Cq-CCT44 Cq-CPM07 Cq-CPM23 Cq-CPM24 Cq-CPM08 Cq-CPM37 Cq-CPM26 Cq-CPM03 Cq-CPM09 Cq-CH61 Cq-CH62 Cq-CGS02 Cq-CGS06 Cq-CG02 Cq-CG13 Cq-CG09	23,7
H2	Parque del Este Cementerio General del Sur, Cementerio Municipal de Chichiriviche Cementerio Municipal San Félix	17	Cq-PE8 Cq-CGS01 Cq-CGS10 Cq-CGS04 Cq-CGS07 Cq-CF11 Cq-CF15 Cq-CF13 Cq-CF19 Cq-CF18 Cq-CB01 Cq-CB03 Cq-CB04 Cq-CB06 Cq-CB14 Cq-CB12 Cq-CB13	22,4
H3	Cementerio de la Colonia Tovar	3	Cq-CCT32 Cq-CCT42 Cq-CCT37	3,9
H4	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT41	1,3
H5	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT46	1,3
H6	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM1	1,3
H7	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM31	1,3
H8	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM38	1,3
H9	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM34	1,3
H10	Cementerio Punta Mulatos	2	Cq-CPM20 Cq-CPM30	2,6
H11	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM36	1,3
H12	Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal Mariño Cementerio General del Sur Cementerio Municipal de San Juan de los Morros	7	Cq-CPM13 Cq-CM07 Cq-CM04 Cq-CM06 Cq-CM02 Cq-CGS03 Cq-CG14	9,1
H13	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM29	1,3
H14	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM05	1,3
H15	Cementerio Municipal Mariño	3	Cq-CM13 Cq-CM14 Cq-CM01	3,9
H16	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH45	1,3
H17	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH44	1,3
H18	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH43	1,3
H19	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH34	1,3
H20	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS08	1,3
H21	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS05	1,3
H22	Cementerio Municipal de San Juan de los Morros	1	Cq-CG11	1,3
H23	Cementerio Municipal de San Juan de los Morros	1	Cq-CG06	1,3
H24	Cementerio Municipal de San Juan de los Morros	1	Cq-CG10	1,3
H25	Cementerio Municipal de San Juan de los Morros	1	Cq-CG03	1,3
H26	Cementerio Municipal de San Juan de los Morros	1	Cq-CG07	1,3
H27	Cementerio Municipal de San Juan de los Morros	1	Cq-CG04	1,3
H28	Cementerio Municipal de Chichiriviche,	1	Cq-CF04	1,3
H29	Cementerio Municipal de Chichiriviche	2	Cq-CF14 Cq-CF12	2,6
H30	Cementerio Municipal de Chichiriviche	1	Cq-CF20	1,3
H31	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CB02	1,3

Fig. 2. Árbol consenso resultante del remuestreo o análisis de Bootstrapping (500 réplicas) para el gen COI en 53 taxa (31 haplotipos) de *Culex quinquefasciatus*. Se utilizaron *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* como grupos externos y *Culex corniger* como grupo hermano. Los valores mostrados representan % de apoyo de grupos en el remuestreo. Los colores muestran los grupos de referencia o externos y los grupos internos apoyados por el remuestreo.



fueron polimórficos y 13,88% filogenéticamente informativos. Los porcentajes de sitios polimórficos pertenecientes a cada población se muestran en la (Tabla II). El gen ND5 mostró 115 sitios variables definiendo 34 haplotipos. La red de haplotipos (Fig. 3) muestra una topología de 3 grupos principales en forma similar que para el gen COI. Un grupo estuvo caracterizado por el haplotipo 13 presente en las poblaciones CCT, CPM, CMM y Chichiriviche. El segundo grupo (haplotipo 9), en las poblaciones de CJM, Bolívar, CEH y CCT; y el tercer grupo (haplotipo 8) presente en las poblaciones CGS y CEH.

La Tabla II muestra adicionalmente el número de individuos por subpoblación (localidades), el número de haplotipos encontrados y el cálculo de la diversidad de haplotipos por subpoblación.

Los haplotipos más comunes fueron H9, H13, y las poblaciones de todas las localidades presentaron haplotipos únicos. La población de Chichiriviche comparte un haplotipo (H16) con Punta Mulatos, otro (H22) con Mariño y un haplotipo

(H26) con la Colonia Tovar, los cuales son separados del haplotipo más común (H13) por uno (H16) y dos sitios segregantes (H22,H26). El tamaño de muestra por sitios, distribución y frecuencia del resto de los haplotipos se muestran en la Tabla IV.

Diferenciación poblacional: Diversidad de haplotipos y diversidad nucleotídica

La diversidad de haplotipos global para el total de las poblaciones de los diferentes cementerios (sin incluir al grupo externo) fue H_t : 0,924. La diversidad de haplotipos obtenidos dentro de cada población se muestran en la Tabla II. La diversidad nucleotídica en el total de las muestras fue Π (t): 0,03457. Los valores de H_{st} correspondientes a *Cx. quinquefasciatus* para cada cementerio estudiado no fueron estadísticamente significativos (Tabla II), indicando que no existe una subdivisión significativa entre las poblaciones de cada localidad muestreada. Los resultados obtenidos indican para el total de las muestras un valor de Tajima negativo D (-0,68345), el cual no fue estadísticamente significativo (P

Fig. 3. Red mínima de haplotipos en las que se muestran las conexiones entre haplotipos de *Culex quinquefasciatus* obtenidos con el gen mitocondrial ND5. Los puntos indican sustituciones de nucleótidos. El número al lado de cada compartimiento corresponde al número del haplotipo y la trama representa la localidad. El tamaño de cada compartimiento es proporcional a la frecuencia de haplotipos en la población.

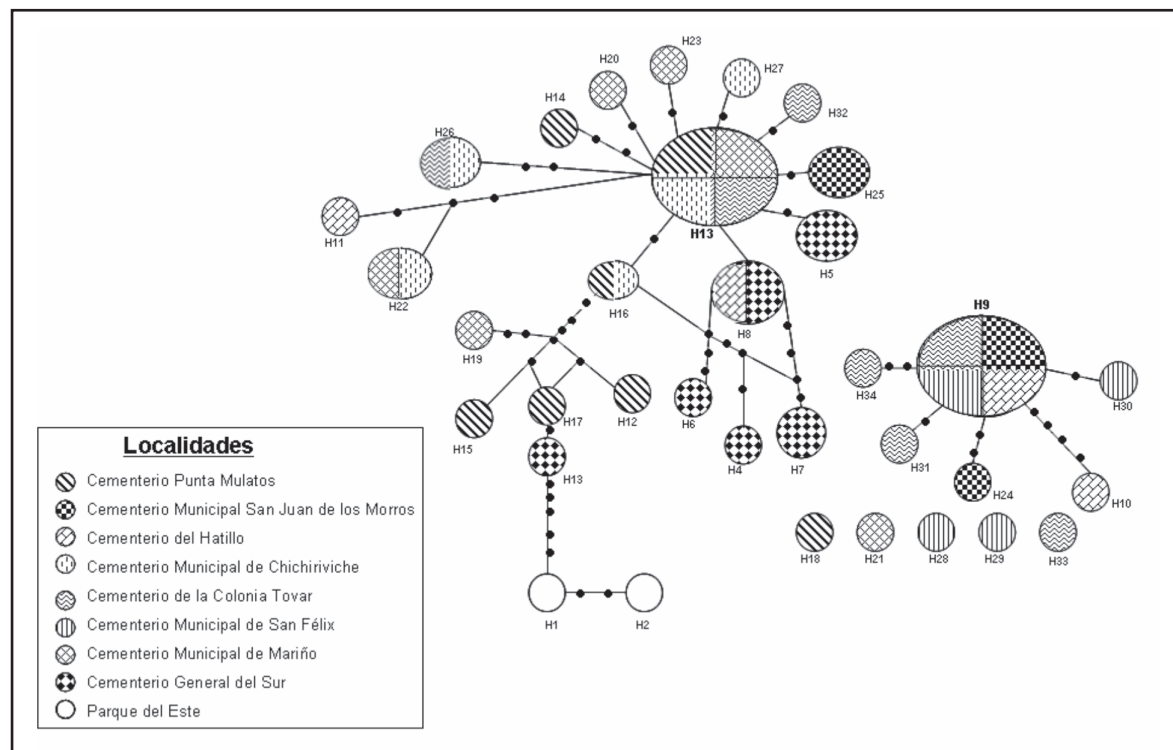


Tabla IV. Frecuencia de haplotipos para el gen ND5 encontrados en un total de 68 individuos de *Culex quinquefasciatus* recolectadas en los diferentes cementerios y/o localidades estudiadas. (Frecuencia= N° de Individuos x haplotipo / N° total individuos).

Hapl	Poblaciones	N° de Individuos	Códigos (identificación-voucher) de las muestras	Frecuencia (%)
H1	Parque del Este	1	CqPE8 (8ND5)	1,5
H2	Parque del Este	1	CqPE5 (5ND5)	1,5
H3	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS02	1,5
H4	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS01	1,5
H5	Cementerio General del Sur	2	Cq-CGS10 Cq-CGS07	2,8
H6	Cementerio General del Sur	1	Cq-CGS04	1,5
H7	Cementerio General del Sur	2	Cq-CGS08 Cq-CGS06	2,8
H8	Cementerio General del Sur Cementerio del Hatillo	5	Cq-CGS05 Cq-CGS03 Cq-CH34 Cq-CH61 Cq-CH62	7,5
H9	Cementerio del Hatillo Cementerio Municipal de San de los Morros Cementerio de la Colonia Tovar Cementerio Municipal San Félix	13	Cq-CH43 Cq-CG11 Cq-CG06 Cq-CG14 Cq-CG03 Cq-CG13 Cq-CB03 Cq-CB04 Cq-CB06 Cq-CB02 Cq-CB11 Cq-CCT31 Cq-CCT32	19,1
H10	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH45	1,5
H11	Cementerio del Hatillo	1	Cq-CH19	1,5
H12	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM08	1,5
H13	Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal Mariño Cementerio de la Colonia Tovar Cementerio Municipal de Chichiriviche	13	Cq-CPM09 Cq-CPM13 Cq-CPM26 Cq-CPM20 Cq-CM14 Cq-CM05 Cq-CM10 Cq-CM17 Cq-CF04 Cq-CF06 Cq-CF05 Cq-CCT41 Cq-CCT13	19,1
H14	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM05	1,5
H15	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM36	1,5
H16	Cementerio Punta Mulatos Cementerio Municipal de Chichiriviche	2	Cq-CPM37 Cq-CF08	2,8
H17	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM31	1,5
H18	Cementerio Punta Mulatos	1	Cq-CPM03	1,5
H19	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM07	1,5
H20	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM04	1,5
H21	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM01	1,5
H22	Cementerio Municipal Mariño Cementerio Municipal de Chichiriviche	2	Cq-CM13 Cq-CF07	2,8
H23	Cementerio Municipal Mariño	1	Cq-CM08	1,5
H24	Cementerio Municipal de San de los Morros	1	Cq-CG02	1,5
H25	Cementerio Municipal de San de los Morros	2	Cq-CG10 Cq-CG04	2,8
H26	Cementerio Municipal de Chichiriviche Cementerio de la Colonia Tovar	2	Cq-CF11 Cq-CCT39	2,8
H27	Cementerio Municipal de Chichiriviche	1	Cq-CF09	1,5
H28	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CB01	1,5
H29	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CB14	1,5
H30	Cementerio Municipal San Félix	1	Cq-CB05	1,5
H31	Cementerio de la Colonia Tovar	1	CqCCT37	1,5
H32	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT28	1,5
H33	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT01	1,5
H34	Cementerio de la Colonia Tovar	1	Cq-CCT21	1,5

>0,10). Los valores de Tajima para cada población fueron muy variables (Tabla II), mostrando valores negativos y estadísticamente no significativos para las poblaciones de cinco localidades (Cementerio General del Sur, Municipal de Chichiriviche, Punta Mulatos, Municipal San Félix, Municipal Mariño) y valores positivos para las poblaciones de tres localidades (Cementerio del Hatillo, Colonia Tovar y Municipal de San Juan de los Morros).

Distancias genéticas y análisis filogenéticos

Las distancias genéticas, indicaron valores K2P intra-especie entre 0 - 7 % (0-1,6% intra *Cx. quinquefasciatus* del Clado BC y del Clado C y de 2-7% entre *Cx. quinquefasciatus* del Clado BC y C), de 0,2-1,1% para *Cx. corniger*, de 0,2% para *Ae. aegypti* y 0,4% para *Ae. albopictus*. Las especies cercanamente relacionadas mostraron distancias entre 0,4-10 %, tal es el caso de *quinquefasciatus* y *corniger* pertenecientes al género *Culex*, mientras que para las especies *aegypti* y *albopictus* del género *Aedes* los valores de distancias estuvieron entre 10-10,8 %. Los valores de distancias genéticas entre los géneros oscilaron entre 11,4 a 11,7%.

De un total de 50 secuencias (425 nucleótidos) provenientes de las 4 especies, 310 posiciones fueron constantes, 38 no informativos y 77 informativos para parsimonia. Los análisis con los caracteres tratados con igual peso y repesados con 1000 réplicas, arrojaron 301 y 80 soluciones parsimoniosas de, longitud (L) 179 y 142, Índice de Consistencia (IC)= 0,765 y 0,859, Índice de Retención (IR)= 0,913 y 0,941 respectivamente.

Las topologías en cada análisis (pesos iguales y repesados) y consensos no muestran diferencias en la agrupación interna del grupo en estudio al igual que para el gen COI. La topología del remuestreo (bootstrapping) muestra solo el Clado A del género *Aedes* (*aegypti* y *albopictus*) como monofilético y basal (100% de apoyo) (Fig. 4). Las secuencias de *Cx. quinquefasciatus* se ubican en parafilia con las de *Cx. corniger*, sin recuperar la monofilia para ambas especies como en el gen COI. En ND5 se muestran dos clados internos, BC con mezcla de *corniger* y *quinquefasciatus* (81%) y el clado C basal a este con solo secuencias de *Cx. quinquefasciatus* (71%) sin ninguna correlación geográfica.

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD (COI+ND5)

Las secuencias de los fragmentos de genes COI y ND5 se alinearon y se combinaron en una matriz única. Se utilizó un total de 44 secuencias comunes provenientes de las 4 especies y 967 nucleótidos (542 gen COI y 425 gen ND5). La prueba de homogeneidad mostró un valor de probabilidad de $P=1$, sugiriendo que no hay conflictos entre las particiones y por tanto las matrices pueden ser combinadas. Del total de caracteres, 699 fueron constantes, 67 no informativos y 200 son informativos para parsimonia.

Los análisis con los caracteres tratados con igual peso y repesados realizados con 1000 réplicas en la búsqueda heurística, arrojaron los siguientes resultados: 60 y 12 soluciones parsimoniosas de longitud (L) 406 y 312, Índice de Consistencia (IC)= 0,764 y 0,861 e Índice de Retención (IR)= 0,899 y 0,934 respectivamente. Las topologías obtenidas en cada análisis (pesos iguales y repesados), y el consenso fueron idénticas.

El análisis combinado (Fig. 5) mostró una topología similar a lo obtenido para el gen COI, mostrando apoyos de grupo mas bajos a los obtenidos para cada gen en particular.

DISCUSIÓN

La longitud de nucleótidos de las secuencias amplificadas para ambos genes fue la esperada de acuerdo con los trabajos previos efectuados en otras especies de mosquitos (Navarro & Weaver, 2004; Hernández, 2006; Birungi & Munstermann, 2002; Mousson *et al.*, 2005). Se observaron diferencias en el contenido de G+C correspondiente a cada gen, siendo más rico en contenido en el gen COI. No se observó una variación significativa en el porcentaje de G+C entre las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* de las diferentes localidades estudiadas, ni una correlación diagnóstica con las otras especies de mosquitos. Igualmente, no se encontró ninguna correlación entre la longitud de la secuencia con el contenido de G+C ni con algún patrón de característico o de diagnóstico para las poblaciones estudiadas, lo que corrobora que este contenido parece ser estable a nivel de insectos y poco variable en categorías mas bajas en la escala zoológica.

Fig. 4. Árbol consenso resultante del remuestreo o análisis Bootstrapping (500 réplicas) para el gen ND5 en 50 taxa (34 haplotipos) de *Culex quinquefasciatus*. Se utilizaron *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* como grupos externos y *Culex corniger* como grupo hermano. Los valores mostrados representan % de apoyo de grupos en el remuestreo. Los colores muestran los grupos de referencia o externos y los grupos internos apoyados por el remuestreo.

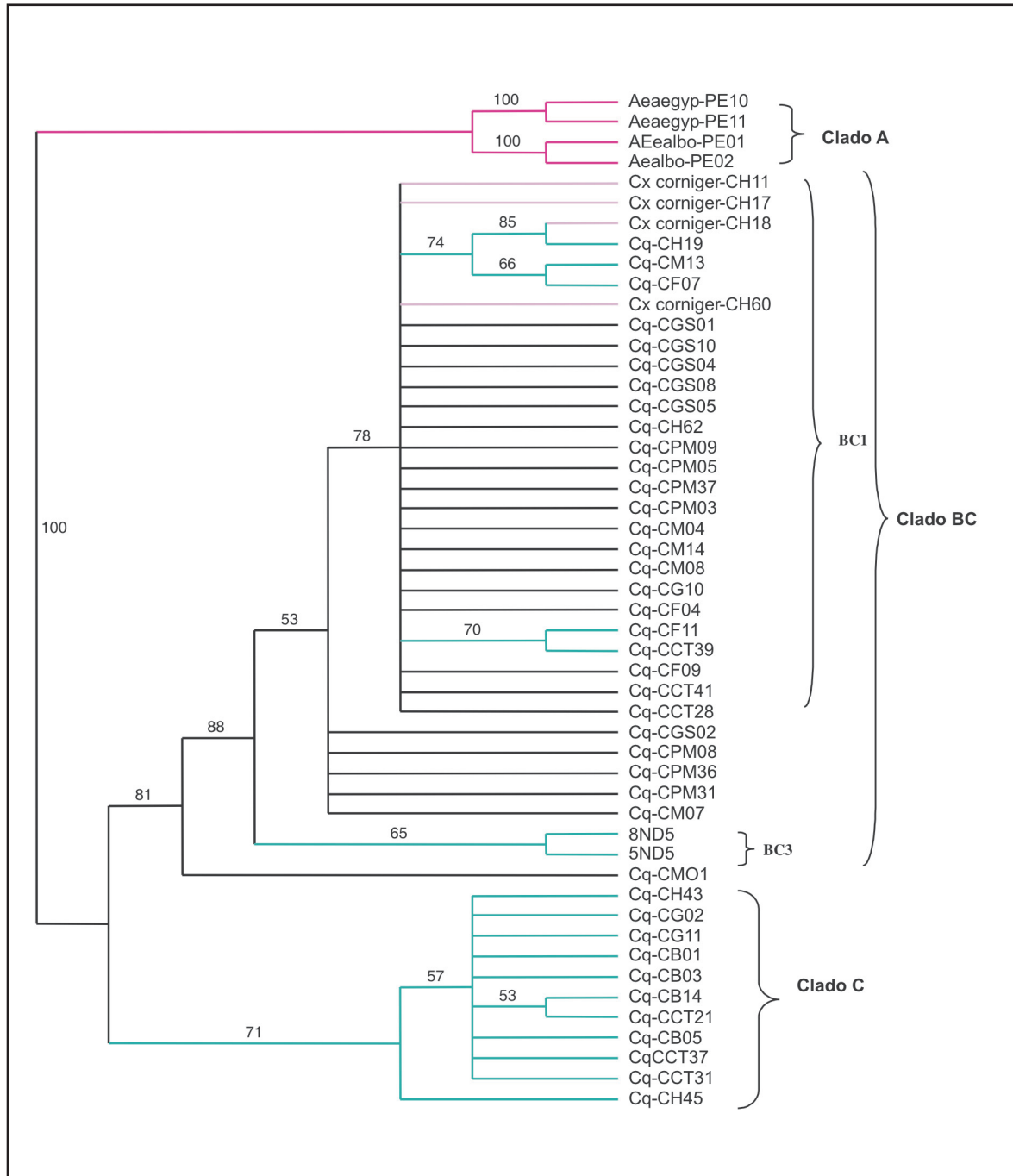
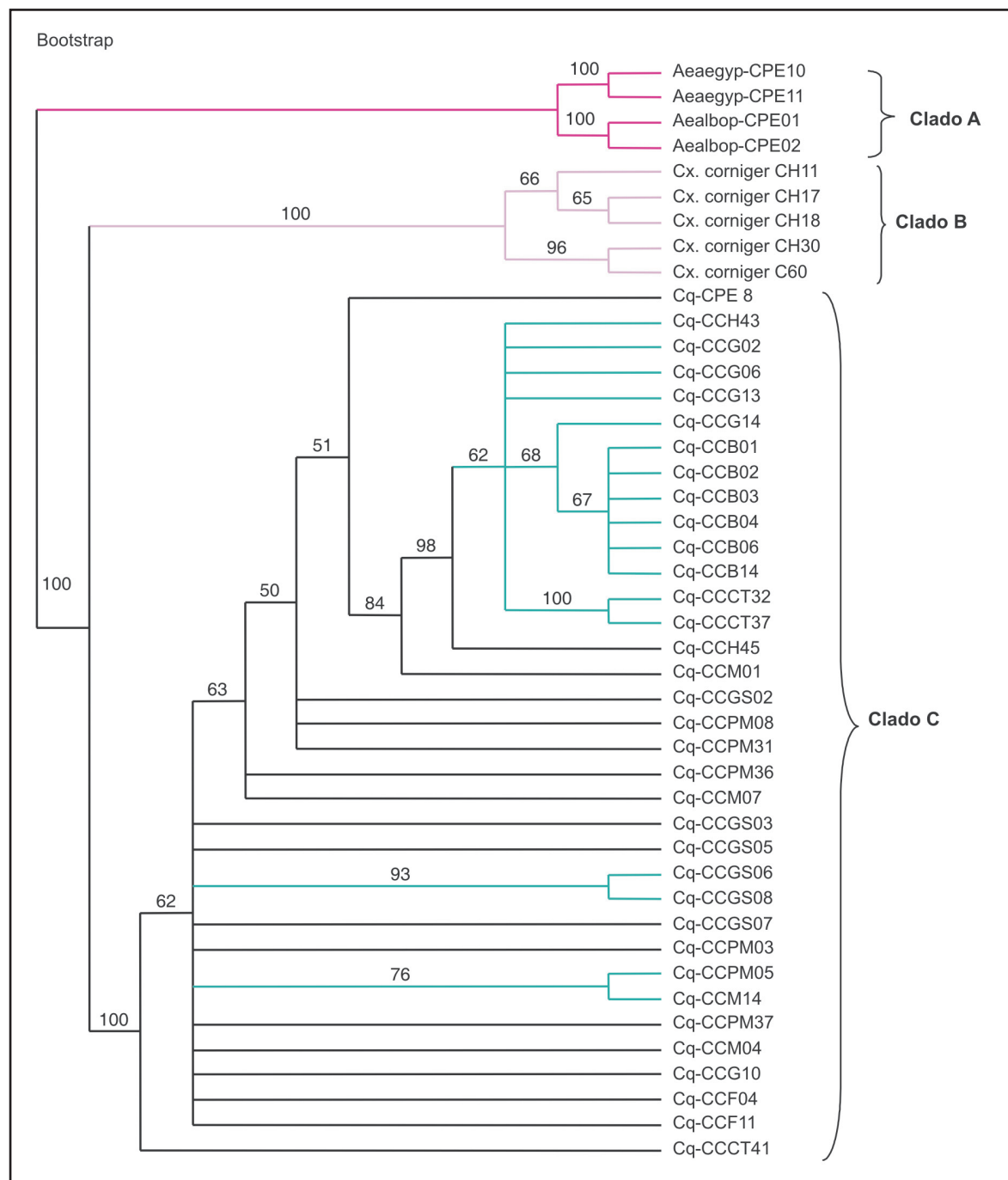


Fig. 5. Árbol resultante del remuestreo o análisis combinado de los genes COI+ND5 en 44 taxa de *Culex quinquefasciatus*. 500 réplicas. *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* como grupos externos y *Culex corniger* como grupo hermano. Los valores mostrados representan % de apoyo de grupos en el remuestreo. Los colores muestran los grupos de referencia o externos y los grupos internos apoyados por el remuestreo.



En trabajos previos, han sido reportados niveles bajos de variación genética (polimorfismo) para poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* haciendo uso del gen mitocondrial COII, el factor de elongación nuclear 1-alpha y acetilcolinesterasa-2 (ACE) como genes nucleares (Hasan *et al.*, 2009) así como la ausencia de estructuración genética entre poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* entre distintas localidades. Sin embargo, nuestros resultados, mostraron niveles altos de variación genética tanto para el gen COI como para el gen ND5. Esta diferencia es corroborada al verificar secuencias del gen COI para esta especie no publicadas (Sharma *et al.* GenBank, no publicado), cuyos análisis de polimorfismos (realizados por nosotros, no mostrados aquí) revelaron valores similares a los mostrados en este trabajo, develando así una diferencia notable entre ambos genes (COI y COII) para esta especie. Estos resultados sugieren que existe una marcada diferencia en la fijación y variabilidad genética entre diferentes genes mitocondriales para esta especie, apoyando la propuesta de Reddy *et al.*, 2012, quienes señalan que se debe realizar el estudio del genoma de *Cx. quinquefasciatus*, el cual debe aportar nuevos paradigmas y respuestas en el control de especies de importancia médica.

Para el gen ND5, entre los ejemplares de *Cx. quinquefasciatus*, los niveles de variación encontrados fueron altos en contraste a las secuencias de ND5 de otras poblaciones de mosquitos, como por ejemplo *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (Birungi y Munstermann, 2002; Mousson *et al.*, 2005; Usmani-Brown *et al.*, 2009; Navarro *et al.* 2012, en prensa). Hasta el presente, no existía información particular para ND5 en esta especie ni otras del género.

El gen ND5 es considerado uno de los genes mitocondriales más variables (Besansky *et al.*, 1997), mientras que el gen COI es mucho más conservado (Cook *et al.*, 2005). Esta condición se corresponde con los resultados, independientemente de las diferencias en longitud que existen entre ambos fragmentos de los genes obtenidos por amplificación (425pb y 542pb). Sin embargo, en ambos casos el grado de polimorfismo observado en *Cx. quinquefasciatus*, varió dependiendo de la localidad, presentando un porcentaje mayor de sitios variables los individuos colectados en las poblaciones de CPM y CEH (estado Vargas y Distrito Capital) para el gen COI, y solo en CGS (Distrito Capital) para el gen ND5. La variación

“dentro” y “entre” para el gen COI fue baja, mientras que el gen ND5 presentó una alta variación “dentro” y la variación “entre” baja. Las diferencias y variaciones entre las localidades en cuanto al grado de polimorfismos puede estar relacionado con la influencia de presiones antropogénicas, por ejemplo, la aplicación intensiva de insecticidas.

En Venezuela, *Cx. quinquefasciatus* no ha sido objeto de control directo por parte de las autoridades sanitarias, sin embargo, el uso frecuente de insecticidas en las campañas de control de *Ae. aegypti*, vector de dengue en Maracay (Cementerio Mariño) estado Aragua (Pérez-Pinto & Molina de Fernández, 2009), (y también la aplicación de insecticidas contra plagas agrícolas en zonas como la Colonia Tovar) puede estar influyendo en el bajo polimorfismo así como la frecuencia de los haplotipos en la población de *Cx. quinquefasciatus* particularmente para esta localidad endemo-epidémica para dengue. Caso contrario podrían ser las localidades del Cementerio El Hatillo y Punta de Mulatos las cuales no tienen una historia de aplicaciones de insecticidas como las realizadas en Maracay.

La actividad permanente de control de vectores y plagas puede considerarse un factor que contribuye a la reducción de la variabilidad, tal y como se observó en las poblaciones de *Culex quinquefasciatus* del cementerio Municipal Mariño (Maracay) con bajo número de haplotipos y de polimorfismos.

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

La red de haplotipos (Figs. 2 y 4) es consistente con los patrones esperados para un rango de expansión poblacional y de especies con gran variabilidad (Templeton, 1998). Los haplotipos H1-H2 para COI y H13-H9 para ND5 representan la distribución de haplotipos comunes ancestrales y de mayor frecuencia,

presentando múltiples conexiones que derivan en haplotipos con menor frecuencia. Ambas redes de haplotipos muestran que no existe un patrón geográfico en la distribución de haplotipos, siendo evidente una mayor conexión ancestro-descendiente de los haplotipos en COI que en ND5, en el cual se muestra el haplotipo común H9 y sus derivados sin conexión al resto de la red. Esto último más la alta variabilidad “dentro” sugiere que este gen puede ser muy útil a nivel poblacional pero una inferencia más confiable para la red de ND5 necesitará un mayor número de muestras, mientras que la menor variación genética en COI y una red más estructurada le confiere una utilidad doble en estudios poblacionales y taxonómicos.

Los valores de H_{ST} obtenidos no fueron estadísticamente significativos en ambos genes, sugiriendo que no existe una subdivisión o divergencia significativa entre las poblaciones de las localidades muestreadas. Los valores de diversidad nucleotídica para el total de las poblaciones fue bajo, a pesar de que los cambios observados (sitios polimórficos) en las secuencias son altos. Esto es debido a que los haplotipos generados aparecen en baja frecuencia, confirmando la ausencia de subdivisión o divergencia entre las diferentes poblaciones estudiadas.

Para ambos genes se observa un número importante de haplotipos únicos (28 de 31 para COI y 28 de 34 para ND5) en concordancia con el elevado número de sitios polimórficos. No obstante el número de muestras por localidad o subpoblación fue bajo, el número elevado de haplotipos y haplotipos únicos, comparado con otras especies como *Ae. aegypti* o *Ae. albopictus* sugieren que existe una marcada variabilidad genética en las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* en Venezuela. Por otra parte, un 20% de los individuos coincidieron en haplotipos para ambos genes, lo que implica que las individuos restantes variaron en uno u otro gen, y que los cambios en sitios polimórficos y la fijación de haplotipos es independiente para ambos genes en una gran proporción de la muestra.

Para el gen ND5, los valores de Tajima obtenidos para el total de la población como para cada población particular fueron negativos y no significativos. También se obtuvo valores tanto positivos como negativos cuando se analiza a cada población por separado. Para el gen COI el valor de Tajima obtenido para el total de la población fue estadísticamente significativo y negativo

(expansión), y sólo para la población del cementerio Municipal Mariño fue estadísticamente significativo y positivo (estabilizadora), con valores mayores a 2 e inferiores a -2.

Los resultados significativos (COI) de los valores de Tajima para el gen COI son consistentes con la hipótesis de mutación neutral. Los valores negativos sugieren que los patrones de polimorfismo son evidencia de continua expansión de la población o de reciente selección, mientras que los valores positivos sugieren y apoyarían como en el caso del cementerio de Mariño (Maracay) una disminución del tamaño poblacional y de los sitios polimórficos probablemente debido a la aplicación de insecticidas. Este resultado apoya la utilización de marcadores genéticos mediante el cual se puede determinar efectos genético-poblacionales producto de factores antrópicos como la aplicación de insecticidas, lo cual era uno de los objetivos del presente trabajo.

En los análisis cladísticos realizados para el gen COI, las distancias y la estructuración filogenética de los clados obtenidos muestran una marcada divergencia entre géneros *Aedes* y *Culex*, y entre dos especies de *Culex* de subgéneros diferentes (*corniger* y *quinquefasciatus*) (Fig. 2). Hernández (2005) con COI, reporta distancias entre 4 y 7,5% entre especies de *Culex* cercanamente relacionadas pero pertenecientes a un mismo subgénero (*Melanoconion*), lo que explica nuestros resultados de 12,44 - 12,89% entre especies de *Culex* pertenecientes a subgéneros diferentes. Los valores de distancias genéticas intraespecie obtenidos para las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* (0,1-2,8%) están muy cercanos a los valores intraespecie reportados por Hernández (2005); por Navarro & Weaver (2004) para otras especies del género *Culex* (0-2%), y por Navarro *et al.*, 2009, para especies pertenecientes al subgénero *Nyssorhynchus* de *Anopheles* (0,3- 1,68%). Estos valores y la topología de los árboles apoyan que el Clado C, en su totalidad, corresponde a una sola entidad filogenética (*Cx. quinquefasciatus*) con un apoyo de 100% incluyendo las secuencias obtenidas de criaderos diferentes (Parque del Este, en desagües), corroborando así que no hay diferencia ni poblacional ni taxonómica entre estas entidades (para ambos genes). Los resultados nos permitieron también corroborar que el gen COI muestra menos variabilidad y define mejor los clados correspondientes con la clasificación morfo taxonómica actual (Fig. 2).

En los análisis para ND5, los valores de distancia y estructuración de los clados muestran marcadas divergencias para este gen entre géneros (*Aedes* y *Culex*), pero no entre especies del mismo género (*Cx. corniger* y *Cx. quinquefasciatus*) y entre poblaciones de una misma especie (*Cx. quinquefasciatus*) (Fig. 4). Se puede observar también en los árboles obtenidos que existe una separación entre especies diferentes pertenecientes al género *Aedes*, sugiriendo que este gen es más conservado y con baja variabilidad genética para estas especies como es demostrado por Birungi & Munstermann (2002), y Mousson *et al.* (2009), Usmani-Brown *et al.* (2009), y Navarro *et al.* (en prensa).

En el caso particular de las especies de *Culex*, la topología de los árboles del gene ND5 (Fig. 4) sugieren una alta tasa de mutación y saturación de cambios posicionales que presentan ambas especies con respecto a dicho gen, y que filogenéticamente, para especies cercanas evolutivamente pertenecientes al género *Culex*, no resulta útil para estudios de sistemática y taxonomía (definición de especie filogenética).

Adicionalmente, en los clados observados dentro del subclado BC1 (Fig. 4) se ubican secuencias de *Cx. corniger* (CH18) y *Cx. quinquefasciatus* (Cq-CH19) idénticas en la misma localidad (El Hatillo). Este resultado sugiere dos hipótesis posibles: 1. Entrecruzamiento y evidencia de introgresión mitocondrial (Cornell *et al.*, 2003; Donnelly *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2009) ó 2. homogenización genética por infección por *Wolbachia* (Armbruster *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2009). Por otra parte, la información aportada por las secuencias obtenidas para el gen COI sugiere que es un gen funcional para estudios de sistemática y taxonomía, así como para estudios poblacionales definiendo claras relaciones a nivel de géneros así como entre especies cercanamente relacionadas. Además resulta ser un buen marcador de las relaciones evolutivas entre poblaciones de una misma especie y entre especies cercanas lo cual lo hace de importancia filogenética (Navarro *et al.*, 2009).

Las topología combinadas (COI+ND5) mantienen la resolución de los clados de grupos de referencia (*Aedes* y *Cx. corniger*) como se observa en la reconstrucción para el gen COI (Fig. 5). Internamente, aunque la estructuración es

diferente en los grupos formados en el clado de *Cx. quinquefasciatus*, y muestran valores más bajos de apoyo de grupos, la homoplasia introducida por los caracteres de ND5 no parece influir en la topología de los análisis combinados con respecto a la de COI. No obstante, la matriz combinada no resuelve el clado interno de *Cx. quinquefasciatus*, mostrando igual politomía sin diferenciación de subpoblaciones, no se observó conflicto en la hipótesis resultantes con respecto a las particiones por separado, dando un mayor apoyo al peso de los caracteres aportados por el gen COI.

La homogeneidad inter-poblacional puede ser resultado de un intervalo de expansión a través de un modo pasivo de dispersión principalmente a través de la actividad humana, ya que se conoce que *Cx. quinquefasciatus* tiene una limitada capacidad de vuelo y dispersión, sumado a la similitud en cuanto al tipo de criadero que esta especie presenta en los diferentes cementerios, manteniéndose así un continuo flujo genético entre algunas poblaciones locales establecidas. Esta homogeneidad es importante para diseño de medidas de control, sugiriendo que una misma estrategia, por ejemplo de insecticidas, puede ser más efectiva si ésta se aplica de forma simultánea en múltiples poblaciones de mosquitos.

Por otra parte, la heterogeneidad intra-poblacional observada puede ser producto de la amplitud de nicho correspondiente a la variedad de criaderos que ocupa esta especie, que van desde floreros en cementerios a recipientes artificiales de todo tipo, cauchos, desagües, cloacas, tanques, etc. Esta es una diferencia notable en comparación con otras especies invasoras como *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* que tienen mayor restricción en los tipos de criaderos en cuanto a su condición de material en suspensión, colonizando ambientes de menor concentración de materia orgánica, razón por la cual estas especies poseen menor heterogeneidad intra-poblacional mostrada en los bajos porcentajes de sitios variables.

Las especies invasoras de *Aedes* poseen huevos resistentes a la desecación lo que les proporciona un potencial invasor extraordinario, característica ausente en *Cx. quinquefasciatus* cuyo éxito debe estar asociado a su alta variabilidad intrínseca que le confiere la capacidad de explotar una diversidad de recipientes en ambientes urbanos como

rurales. Por otra parte, la resistencia a desecación de los huevos en *Aedes*, le confiere mayor vagilidad y segura dispersión en fase latente, lo que seguramente coloca a estas poblaciones en continuos “cuellos de botella” poblacionales, mientras que las poblaciones de *Cx quinquefasciatus* puede encontrarse en continua expansión, lo que resulta en mayor diversidad de haplotipos y variabilidad intra-poblacional.

Los resultados obtenidos con ambos genes sugieren que las poblaciones de *Cx. quinquefasciatus* mostraron una alta homogeneidad genética, a pesar del alto grado de polimorfismo observado, y no se encontró divergencia entre haplotipos. Se encontró una alta variabilidad “dentro” de las poblaciones (poblaciones heterogéneas) con presencia de diferentes haplotipos pero sin generar estructuración filogenética (clados monofiléticos equivalentes a subpoblaciones geográficas) de las secuencias/individuos, apoyando así la hipótesis de la presencia de una misma entidad taxonómica.

Finalmente, los cambios genético-poblacionales en esta especie parecen estar determinados en gran medida por la disminución poblacional por el efecto de insecticidas en localidades de alta presión por enfermedades endémo-epidémicas como el Dengue, o posiblemente por la acción de prolongados períodos de sequía que reducirían la disponibilidad de criaderos, debido a la conocida incapacidad de sus huevos a permanecer viables en ausencia de agua, mientras que en localidades sin presión antropogénica determinaría un patrón de continua expansión genética, que se ve reflejada en la gran variabilidad y gran número de haplotipos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no se presentaron conflictos de intereses de ninguna índole durante el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A las Lic. Adriana Zorrilla, Fabiola Del Ventura, y Sr. Nelson Moncada, por su colaboración en el trabajo de campo y apoyo en el laboratorio. A la Dra. Darjaniva Molina de Fernández y la MSc. Marlene Salazar del Instituto de Altos Estudios en

Salud Pública por su valioso aporte con las muestras de varias localidades. A los revisores anónimos que aportaron importantes comentarios y sugerencias en la mejora de este trabajo. Financiamiento: FONACIT, Misión Ciencia No. 2008000911-4 (JCN) y CDCH PG-03-7916-2009/1 (JCN).

REFERENCIAS

- Almirón W. R., Humeres S. G. & Gardenal S. N. (1995). Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **90**: 469-73.
- Armbruster P., Damsky W. E., Giordano R., Birungi J., Munstermann L. E. & Conn J. E. (2003). Infection of New- and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: implications for host mitochondrial DNA evolution. *J. Med. Entomol.* **40**: 356-60
- Arrivillaga J. C., Norris D., Feliciangeli M. & Lanzaro M. (2002). Phylogeography of the Neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* inferred from mitochondrial DNA sequences. *Infect. Genet. Evol.* **2**: 83-95.
- Avise J. C. (1994). *Molecular Marker, natural history and evolution*. Chapman y Hall, New York. USA.
- Avise J. C., Arnold J., Ball R. M., Bermingham E., Lamb. T., Niegel J. E., Reeb C. A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol Syst.* **18**: 489-522.
- Belkin J. N., Schick R. X., Galindo P. & Aitken T. H. G. (1967). Mosquito Studies (Diptera: Culicidae). I. A project for a systematic study of the mosquitoes of Middle America. *Contrib. Am. Entomol. Inst.* **1**: 1-17.
- Besansky N. J., Lehmann T., Fahey G. T., Fontenille D., Braack L. E., Hawley W. A., et al. (1997). Patterns of mitochondrial variation within and between African malaria vectors, *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*, suggest extensive flow. *Genetics* **147**: 1817-1828.

- Birungi J. & Munstermann L. (2002). Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations Based on Mitochondrial ND5 sequences: evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **95**: 125-132.
- Brewer, M., Bufa L., Almirón W.. 1987. *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina. *Rev. Per. Entomol.*; **29**:69-72.
- Brown W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. pp. 95-130. En: R. J. MacIntyre (ed.). *Molecular evolutionary genetics*. Plenum, Nueva York, USA.
- Cornell A. J, McAbee R. D, Rasgon J., Stanich M. A., Scott T. W. & Coetzee M. (2003). Differences in extent of genetic introgression between sympatric *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *J. Med. Entomol.* **40**: 36-51.
- Clement M., Posada D. & Crandall K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657-1660.
- Cook S., Diallo M., Sall A., Cooper A. & Holmes E. 2005. Mitochondrial markers for molecular identification of *Aedes* (Diptera: Culicidae) involved in transmission of arboviral disease in West Africa. *J. Med. Entomol.* **42**: 19-28.
- Cova-García P., Sutil E. & Rausseo J. (1966). Mosquitos (Culicinos) de Venezuela. Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social Caracas - Venezuela.
- Del Ventura F. (2008). *Patrones de distribución, análisis geoespacial y determinación de áreas de endemismo de los mosquitos (Diptera: Culicidae) de Venezuela*. Trabajo Especial de Grado, Fac. Ciencias, UCV. Caracas, Venezuela.
- Donnelly M. J., Pinto J., Girod R., Besansky N. J. & Lehmann T.. (2004). Revisiting the role of introgression vs shared ancestral polymorphisms as key processes shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the Anopheles gambiae complex. *Heredity.* **92**, 61–68.
- Farid H. A., Hammad R. E., Hassan M. M., Morsy Z. S., Kamal I. H., Weil G. J., *et al.* (2001). Detection of *Wuchereria bancrofti* in mosquitoes by the polymerase chain reaction: a potentially useful tool for large-scale control programmes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **95**: 29-32.
- Farris J. S., Källersjö M., Kluge A. G. & Bult ?. (1995). Testing significance of incongruence. *Cladistics.* **10**: 315-319.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* **39**: 783-791.
- Futuyma D. J. (1998). *Evolutionary Biology*. 3a. Edición. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA
- Gomes B., Sousa C. A., Novo M. T., Freitas F. B., Alves R., Côrte-Real A. R., *et al.* (2009). Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evol Biol.* **9**: 262.
- Hasan A. U., Setsuo S., Uddin S. M., Fujimoto C., Hurada M., Rahman S. M., *et al.* (2009). Molecular phylogeography of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in central Bangladesh. *Acta Tropica* **112**: 106-114.
- Herbeck J. T. & Novembre J. (2003). Codon usage patterns in Cytochrome Oxidase I across multiple insect orders. *J. Mol. Evol.* **56**: 691-701.
- Hernández C. (2005). *Divergencia Filogenética estimada asumiendo un reloj molecular (ADMmt) en vectores de Encefalitis Equina Venezolana: Culex (Melanoconion) taeniopus y Cx. (Mel) cedecei (Diptera: Culicidae)*. Trabajo Especial de Grado, Fac. Ciencias, UCV. Caracas, Venezuela.
- Hoy M. A. (2003). *Insect Molecular Genetics*, 2nd edn, Academic Press/Elsevier, San Diego, California. USA.
- Hubalek Z., & Halouzka J. (1999). West Nile fever: a reemerging mosquito borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 643-650.

- Hudson R. R., Boos D. D. & Kaplan N. L. (1992). A statistically test for detecting geographic subdivision. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 138-151.
- Huelsenbeck J. P., Bull J. J. & Cunningham C. W. (1996). Combining data in phylogenetic analysis. *Trends. Ecol. Evol.* **11**: 152-158.
- Kambhampati S. & Smith P. T. (1995). PCR primer for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect. Mol. Biol.* **4**: 233-236.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Krzywinski J. M. & Besansky N. J. (2003). Molecular systematic of *Anopheles*: from subgenerato subpopulations. *Annu. Rev. Entomol.* **48**: 111-139.
- Lai C. H., Tung K. C., Ooi H. K. & Wang J. S. (2000). Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as a vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microPlarial density. *Vet. Parasitol.* **90**: 231-237.
- Lanciotti R. S., Kerst A. J., Nasci R. S., Godsey, M. S., Mitchell C. J., Savage H. M., *et al.* (2000). Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4066-4071.
- Lane J. (1953). *Neotropical Culicidae. Dixinae, Chaborinae and Culicidae, Tribu Anophelini, Toxorhynchitinae and Culicini (Genus Culex only)*. University of Sao Paulo, Brazil.
- Mousson L., Dauga C., Garerigues T., Schaffner F., Vazeille M., & Failloux A. (2005). Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res.* **85**: 1-11.
- Navarro J. C., 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. C. & Weaver S. C. (2004). Molecular phylogeny of the vomerifer and Pedroi Groups in the Spissipes Section of the subgenus *Culex (Melanoconion)*. *J. Med. Entomol.* **41**: 575-581.
- Navarro J. C., Hernández C., Rangel-Díaz G., Guerrero E., Rangel Y., & Arrivillaga J. (2009). Invalidación de autapomorfias putativas mediante análisis de filogenia molecular en *Anopheles* subgénero *Nyssorhynchus*. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 35-53.
- Navarro J. C., Zorrilla A., Del Ventura F. & Liria J. (2010). Registros de mayor altitud para mosquitos (Diptera: Culicidae) para Venezuela. *Rev. Biol. Trop. (Internat. J. Biol. & Conserv.)*. **58**: 245-254.
- Navarro J. C., L. Quintero, A. Zorrilla & R González (2012). Molecular tracing of the invasive mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Northern South America. *J. Med. Entomol.* (en prensa)
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M., Maruyama, T. & Chakraborty R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution.* **29**: 1-10.
- Pérez-Pinto E. & Molina de Fernández D. (2009). Resistencia focal a insecticidas organosintéticos en *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) de diferentes municipios del estado Aragua, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **49**: 143- 150.
- Reddy N., B. P. Labbe, P., & Corbel V. (2012). *Culex* genome is not just another genome for comparative genomics. *Parasites & Vectors.* **5**: 63 doi:10.1186/1756-3305-5-63.
- Rivas F., Díaz L., Cárdenas V., Daza E., Bruzón L., Alcalá A., *et al.* (1997). Epidemic Venezuelan equine encephalitis in La Guajira, Colombia, 1995. *J. Infect. Dis.* **175**: 828-32.
- Rozas J. & Rozas R. (1999). DNAsp version 3 an integrated program for molecular populations genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics.* **15**:174-175.
- Sabatinielli G, Ranieri E., Gianzi F.P, Papakai M. & Cancrini G. 1994. Role de *Culex quinquefasciatus*

- dans la transmission de la filariose de Bancroft dans la République Fédérale Islamique des Comores (Océan Indien). *Parasite*. **1**: 71-6.
- Salazar M. (2010). *Caracterización bioquímica de la resistencia a insecticidas en cepas de campo de Culex quinquefasciatus Say 1823 (Diptera: Culicidae) de diferentes regiones de Venezuela*. Trabajo Especial de Grado, Fac. Agronomía, UCV. Maracay, Venezuela.
- Sanderson M. J. & Shaffer H. B. (2002). Troubleshooting molecular phylogenetic analysis. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **33**: 49-72.
- Sharma A. K., Mendki M. J., Tikar S. N., Chandel K., Sukumaran D. & Parashar B. D. (2009). Genetic variability in geographical populations of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from India based on random amplified polymorphic DNA analysis. *Acta Tropica*. **112**: 71-76.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., & Flook P. (1994). Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 651-701.
- Sutil O. E. (1980). Enumeración histórica y geográfica de las especies de Culicidae de Venezuela ordenadas según su taxonomía. *Bol. Dir. Malariol. San. Amb.* **20**: 1-32.
- Swofford D. L. (2002). PAUP a.0b10. *Phylogenetic analysis using parsimony*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, USA.
- Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis. *Genetic*. **123**: 858-595.
- Templeton A. R. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* **7**: 381-397.
- Thompson J. D., Higgins D. G., & Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Usmani-Brown S., Cohnstedt L. & Munstermann L. E. (2009). Population Genetics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Invading Populations, Using Mitochondrial nicotinamide Adenine Dinucleotide Dehydrogenase Subunit 5 Sequences. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **102**: 144-150.
- Walker T., Song S. & Sinkins S. P. (2009). *Wolbachia* in the *Culex pipiens* group mosquitoes: introgression and superinfection. *J. Hered.* **100**: 192-196.
- Weaver S., Salas R., Rico-Hesse R., Ludwig G., Oberste S., Boshell J., *et al.* (1996). Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. *Lancet*. **348**: 436-40.

Recibido el 06/10/2011
Aceptado el 05/04/2012

