

Análisis morfológico y molecular evidencia problemas al identificar *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) por claves dicotómicas

Morphological and molecular analyses demonstrate identification problems of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) using dichotomous keys

GIOVAN F. GÓMEZ^{1,2}, ASTRID V. CIENFUEGOS^{1,3}, LINA A. GUTIÉRREZ^{1,4},
JAN E. CONN⁵ y MARGARITA M. CORREA^{1,6}

Resumen: El Grupo Oswaldoi, subgénero *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae), incluye 16 especies. Algunas de estas especies presentan una alta variabilidad morfológica intraespecífica y similitud interespecie; lo anterior puede ocasionar dificultad en la identificación de la hembra al usar las claves morfológicas, como ocurre con *Anopheles nuneztovari*, considerado vector primario de malaria en Colombia. En este trabajo se comparó la utilidad de cinco claves morfológicas para la identificación de especímenes *A. nuneztovari* recolectados en la localidad de Puerto Anchica, Montelibano, Córdoba, Colombia. Se analizaron tres relaciones morfométricas y se confirmó la identificación morfológica utilizando la técnica PCR-RFLP basada en secuencias ITS2. El análisis de 41 hembras usando las claves, mostró que los especímenes *A. nuneztovari* presentaron solapamiento morfológico con otras especies del Grupo Oswaldoi, como: *A. rangeli*, *A. oswaldoi*, *A. evansae* y *A. benarrochi*. El análisis molecular confirmó que todos los especímenes corresponden a *A. nuneztovari*. Dado que el uso de claves morfológicas continúa siendo la estrategia de elección para la identificación de anofelinos, los resultados sugieren que en caso de especies problemáticas, es conveniente confirmar la identificación mediante herramientas moleculares desarrolladas con el respaldo de la identificación de estadios inmaduros.

Palabras clave: Identificación morfológica. Identificación molecular. Variación intraespecie. PCR-RFLP. Mosquitos.

Abstract: The Oswaldoi Group, subgenus *Nyssorhynchus* (Diptera: Culicidae), includes 16 species. Some of these species exhibit high intraspecific morphological variability and interspecific similarity; this can lead to difficulty in the identification of females by using morphological keys, as is the case with *Anopheles nuneztovari*, considered a primary malaria vector in Colombia. In this study we compared the usefulness of five morphological keys for the identification of *A. nuneztovari* specimens collected in the locality of Puerto Anchica, Montelibano, Córdoba, Colombia. Three morphometric ratios were analyzed and morphological identification results were confirmed using the PCR-RFLP technique based on ITS2 sequences. The analysis of 41 females using the keys showed that *A. nuneztovari* specimens presented overlap with other species of the Oswaldoi Group, such as *A. rangeli*, *A. oswaldoi*, *A. evansae* and *A. benarrochi*. Molecular analysis confirmed that all of the specimens corresponded to *A. nuneztovari*. Because the use of morphological keys continue to be a strategy of choice for the identification of anophelines, the results suggest that in the case of problematic species, it is convenient to confirm identification using molecular methods developed with the support of the identification of immature stages.

Key words: Morphological identification. Molecular identification. Intraspecific variation. PCR-RFLP. Mosquitoes.

Introducción

La malaria continúa siendo un problema de salud pública en Colombia con un registro de 110.480 casos durante el año 2007 (INS 2007). Mosquitos hembra del género *Anopheles* Meigen, 1818 son los responsables de la transmisión del *Plasmodium* Laveran, 1880 causante de la enfermedad. En el país, se han registrado 43 especies de *Anopheles*, once de éstas pertenecen al subgénero *Nyssorhynchus* Blanchard, 1902 (Diptera: Culicidae), en el cual se incluyen las especies consideradas vectores primarios de malaria: *A. albimanus* Wiedemann, 1821, *A. darlingi* Root, 1926, *A. nuneztovari* (Gabaldón, 1940) (Olano *et al.* 2001). Este subgénero contiene especies crípticas y hermanas (Faran 1980), que al presentarse en simpatria, dificultan su identificación. En algunos casos, la identificación correcta puede lograrse mediante la

observación de todos los estadios de vida del mosquito o del análisis de los genitales de los machos, sin embargo, esto implica procedimientos más complejos y prolongados (Fritz *et al.* 2004) al punto que los caracteres externos pueden no ser suficientes para una adecuada identificación debido a la gran variabilidad fenotípica intraespecífica y similitud interespecífica (Fernández *et al.* 2004).

La correcta identificación de las especies anofelinas es esencial para lograr una mejor comprensión de la dinámica de transmisión de la malaria y para el desarrollo satisfactorio de los estudios de resistencia a insecticidas y de incriminación vectorial (Brochero y Quiñones 2008). La información obtenida permite el diseño, monitoreo y evaluación de medidas integradas y selectivas de control vectorial a nivel local y regional, como ha sido recomendado por la Organización Mundial de la Salud (Collins *et al.* 2000; WHO 2003). Los

¹ Grupo de Microbiología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108, 5-437. A.A. 1226, Medellín, Colombia.

² Est. de Doctorado en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad de Antioquia. giovan_fernando@yahoo.com.ar.

³ M.Sc. Universidad de Antioquia. vanessa.cienfuegos@gmail.com.

⁴ Ph.D. Universidad de Antioquia. liangutibui@gmail.com.

⁵ Ph.D. Griffin Laboratory, Wadsworth Center, New York State Department of Health, USA. jconn@wadsworth.org.

⁶ Ph.D. mcorrea@quimbaya.udea.edu.co. Autor para correspondencia.

métodos empleados actualmente para la identificación de las especies anofelinas incluyen estrategias de tipo morfológico (Sallum *et al.* 2002; Fajardo *et al.* 2008) y molecular (Fritz *et al.* 2004; Zapata *et al.* 2007; Cienfuegos *et al.* 2008). El estudio de la quetotaxia de las larvas de cuarto instar y de los caracteres morfológicos de los genitales de los machos han sido los caracteres recomendados para la determinación de especies (Faran 1980; Flores-Mendoza *et al.* 2004), sin embargo, la estrategia usada frecuentemente en los estudios entomológicos de campo en Colombia es la identificación de las hembras anofelinas utilizando claves morfológicas (Quiñones *et al.* 1987; Pérez *et al.* 1999). En particular, para las hembras del subgénero *Nyssorhynchus*, Grupo Oswaldoi, tres relaciones morfométricas, entre otras características, han sido utilizadas a menudo para identificar las especies (Faran y Linthicum 1981; Suárez *et al.* 1988; Rubio-Palis 2000; González y Carrejo 2007; Fajardo *et al.* 2008). Estas tres relaciones comprenden: la longitud del área oscura del tarsómero II de la pata posterior / longitud total del tarsómero II (DS-TaIII₂/TaIII₂), la longitud de la mancha subcostal clara / la longitud de la mancha sectorial oscura distal (SCP/DSD) y la longitud de la mancha clara humeral / la longitud de la mancha prehumeral oscura (HP/PHD) (Wilkerson y Peyton 1990).

Aunque los caracteres morfológicos se utilizan comúnmente en la identificación de anofelinos, éstos pueden presentar serias limitaciones durante la identificación de especies similares o indistinguibles morfológicamente (Norris 2002). En los últimos años, el desarrollo de metodologías moleculares ha permitido la correcta identificación de especies problemáticas (Van Bortel *et al.* 2001; Alam *et al.* 2007; Zapata *et al.* 2007; Cienfuegos *et al.* 2008). En particular, el análisis por PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism: Reacción en Cadena de la Polimerasa - Polimorfismo del Tamaño de los Fragmentos de Restricción) del espaciador interno transcrito 2 (ITS2) del ADN ribosomal ha sido una de las metodologías más utilizadas para la diferenciación de numerosas especies de *Anopheles*, especialmente para aquellas que presentan solapamiento en los caracteres de la hembra (Sallum *et al.* 2002; Garros *et al.* 2004; Li y Wilkerson 2005; Ruiz *et al.* 2005; Chen *et al.* 2006; Zapata *et al.* 2007; Matson *et al.* 2008). El análisis de secuencias ITS2 ha demostrado poseer una baja variabilidad intraespecie y mayor variabilidad interespecie, característica importante para lograr la correcta discriminación de las especies anofelinas (Marrelli *et al.* 2006; Zapata *et al.* 2007; Matson *et al.* 2008) y de otros insectos (Collins y Paskewitz 1996).

Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari Gabaldón, 1940 es reconocido vector primario de malaria en Colombia (Olano *et al.* 2001; Gutiérrez *et al.* 2009) y ha sido incriminado en la transmisión de esta enfermedad en Perú (Hayes *et al.* 1987), Venezuela (Rubio-Palis 2000) y Brasil (Arruda *et al.* 1986; Tadei *et al.* 1998). Varios estudios han sugerido que esta especie es un complejo de especies hermanas y crípticas (Sallum *et al.* 2008), debido a la alta variabilidad morfológica intraespecífica observada en la hembra de *A. nuneztovari* (Hribar 1995; Fajardo *et al.* 2008), similitud interespecífica (Calle *et al.* 2008), diferencias ecológicas (Elliot 1972), variación fenotípica de los genitales masculinos (Hribar 1994) y diferencias genéticas entre poblaciones (Scarpassa *et al.* 1999; Mirabello y Conn 2008). Investigaciones realizadas con anofelinos de Colombia han dado cuenta de la posibili-

dad de una identificación errada de los especímenes *A. nuneztovari* debido al solapamiento morfológico con otras especies (Zapata *et al.* 2007; Cienfuegos *et al.* 2008; Gutiérrez *et al.* 2008), por lo que en estas investigaciones se ha sugerido el uso de la prueba molecular PCR-RFLP-ITS2 para lograr una adecuada identificación de la especie.

Con el fin de determinar la utilidad de caracteres morfológicos específicos en la identificación de especímenes *A. nuneztovari* usando las claves disponibles, en el presente trabajo se analizaron los rangos de las tres relaciones morfométricas, HP/PHD, SCP/DSD, DS-TaIII₂/TaIII₂, en comparación con los rangos reportados por varios autores y se utilizó la técnica molecular PCR-RFLP-ITS2 para confirmar la identificación de los mosquitos *A. nuneztovari* recolectados en la localidad de Puerto Anchica, Montelibano, departamento de Córdoba, Colombia.

Materiales y Métodos

Área de estudio y recolección de mosquitos. Montelibano es el tercer municipio más extenso de Córdoba y tiene características de selva húmeda tropical, una temperatura promedio anual de 28°C y se encuentra ubicado a una altitud de 50 msnm (IGAC 2002). Reportes del IDEAM (2008) para los últimos cinco años, muestran que este municipio ha presentado una precipitación promedio anual de 2500 mm y humedad relativa del 78% en tiempo de sequía y de 81% en períodos de lluvia (mayo-septiembre). La malaria en este municipio constituye un problema grave de salud pública, para el año 2007 se presentó un IPA (Índice Parasitario Anual) de 101,9 y un registro durante el periodo 2001-2007 de 49.998 casos, lo cual representa el 20,4% del total de casos reportados en el departamento de Córdoba (Gobernación de Córdoba 2008).

Los mosquitos hembra se recolectaron entre julio y noviembre de 2007, mediante cebo humano, usando un aspirador bucal (WHO 2003). La recolección se realizó entre las 18:00-06:00 horas en el intra y peridomicilio, en el corregimiento de Puerto Anchica (PA) (7°52'42"N, 75°51'51"W), Montelibano, Córdoba (Fig. 1). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Centro de Investigaciones Médicas la Universidad de Antioquia (código CIM 0520 ADV).

Identificación morfológica. Se seleccionaron 41 mosquitos en buen estado y con un patrón de manchas del ala intacto para evaluarlos con respecto a las tres relaciones morfométricas (HP/PHD, SCP/DSD, DS-TaIII₂/TaIII₂) reportadas en las claves. Los mosquitos seleccionados se identificaron independientemente, utilizando cinco claves morfológicas: Faran y Linthicum (1981), Suárez *et al.* (1988), Delgado y Rubio-Palis (1993), Rubio-Palis (2000), González y Carrejo (2007). Adicionalmente, se evaluaron los rangos reportados por Calle *et al.* (2002) para estas tres relaciones morfométricas. Se realizó el montaje de las alas y una pata posterior de cada espécimen como soporte de la identificación morfológica; el material restante se almacenó en etanol al 95%. Se utilizó un estereoscopio modelo BTB-3A (BOECO, Alemania) con ocular 20X con micrómetro (100 div= 10mm) y zoom 4,5X para medir la longitud de las siguientes manchas en la vena costa (Wilkerson y Peyton 1990): prehumeral oscura (PHD), humeral clara (HP), sectorial oscura distal (DSD), subcostal clara (SCP). Se midió la longitud total del tarsómero dos (TaIII₂) y de su mancha oscura (DS-TaIII₂). Las medidas se

realizaron por duplicado y los valores reportados corresponden a la Media de estas mediciones. Para cada espécimen se establecieron las tres relaciones más importantes que ayudan en la diferenciación de las especies del Grupo Oswaldoi: HP/PHD, SCP/DSD y DS-TaIII₂/TaIII₂ (Fig. 2). Se realizó un análisis comparativo entre las relaciones para cada hembra y los rangos reportados en las claves morfológicas para determinar la especie.

Identificación molecular. Se realizó una PCR-RFLP de la región ITS2 para confirmar la asignación de especie de los mosquitos identificados previamente usando las diferentes claves morfológicas. La región ITS2 se amplificó a partir de una pata agregada directamente a la reacción de amplificación y se utilizaron los cebadores reportados por Beebe y Saul (1995) y las condiciones de PCR y RFLP descritas por Zapata *et al.* (2007) y Cienfuegos *et al.* (2008).

Análisis estadístico. Los datos de las relaciones morfométricas, la identificación morfológica y molecular para cada individuo fueron tabulados utilizando el programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete GraphPad (GraphPad Prism versión 4.00 para Windows, San Diego, CA, USA).

Resultados

La identificación morfológica de los 41 especímenes varió dependiendo de la clave utilizada; según algunas de éstas, entre los individuos evaluados se presentaban varias de las especies del Grupo Oswaldoi: *A. nuneztovari*, *A. rangeli* Gabaldón, Cova García & López, 1940, *A. oswaldoi* (Peryassú, 1922), *A. evansae* (Brèthes, 1926) y *A. benarrochi* Gabaldón, Cova & López, 1941 (Tabla 1). Sin embargo, la identificación usando el marcador molecular mediante la PCR-RFLP de la región ITS2, reveló que todos los especímenes correspondían a *A. nuneztovari* (Fig. 3).

Uno de los caracteres discriminatorios definido en las claves taxonómicas para *Anopheles* de la Sección Albimanus, es la relación en la pata posterior de la mancha oscura del segundo tarsómero, respecto a la longitud del segmento DS-

TaIII₂/TaIII₂. En los especímenes analizados se encontró un rango de 0,13-0,34 para esta relación, diferente a lo descrito por varios autores (Tabla 2); ninguno de estos rangos comprende los valores mínimo y máximo hallados en el presente estudio, excepto por el rango de 0,11-0,44 registrado por Delgado y Rubio-Palis (1993). Es importante resaltar que el valor más bajo encontrado para la relación DS-TaIII₂/TaIII₂ (0,13), es inferior a los valores reportados previamente (Tabla 2), lo que puede conducir a la identificación errónea de algunos mosquitos como *A. oswaldoi*, mientras que con la clave propuesta por Delgado y Rubio-Palis (1993), que reporta un límite inferior menor, si se logra una mejor aproximación a la identificación correcta de *A. nuneztovari* en esta localidad. Con respecto al límite superior, el valor establecido por Faran y Linthicum (1981) de 0,32, aunque próximo, es menor al encontrado de 0,34, lo cual también podría llevar a una identificación incorrecta del espécimen.

Las manchas de la vena Costa del ala presentaron gran variabilidad. La relación HP/PHD varió entre 0,64-2,60, cuyo límite inferior es menor a lo señalado por Faran y Linthicum (1981), Suárez *et al.* (1988), Rubio-Palis (2000), Calle *et al.* (2002), y mayor a lo registrado en las claves de Delgado y Rubio-Palis (1993) y González y Carrejo (2007) (Tabla 2). Igualmente, la relación SCP/DSD presentó un rango de 0,28-0,68, evidenciando que el límite inferior es menor al reportado por Calle *et al.* (2002) de 0,36, pero cercano a lo reportado por los otros autores previamente citados. El 63% de los mosquitos analizados presentaron una relación SCP/DSD mayor a 0,49 y se confirmaron por PCR-RFLP-ITS2 como *A. nuneztovari*, pero se identificaron erróneamente como *A. rangeli* cuando se usaron como guías las claves de Suárez *et al.* (1988) y Rubio-Palis (2000), que establecen una relación SCP/DSD menor a 0,49 para *A. nuneztovari*.

En general, el análisis de las tres relaciones morfométricas para cada mosquito utilizando cada una de las claves, mostró solapamiento entre las relaciones morfométricas consideradas diagnósticas de especie en *A. nuneztovari*, con varias de las especies pertenecientes al Grupo Oswaldoi, y en todas las claves se encontraron casos donde no fue posible definir la identidad de algunos especímenes, presentándose el valor máximo de 73% con la clave de Rubio-Palis (2000) y el mínimo de 5% con la clave de Delgado y Rubio-Palis (1993) (Tabla 1); esto se debió a que no se encontró una correlación con los rangos propuestos en la literatura (Tabla 2). Los resultados mostraron que el porcentaje de individuos de *A. nuneztovari* identificados adecuadamente utilizando las claves morfológicas es variable dependiendo de los rangos de las relaciones morfométricas y características cualitativas definidas por el autor de cada clave; mientras que las claves de Delgado y Rubio-Palis (1993) y la de González y Carrejo (2007) permiten identificar adecuadamente un 78% y 63% de los individuos respectivamente, algunas claves como la de Suárez *et al.* (1988) señalan como *A. nuneztovari* sólo el 12%.

Discusión

La determinación de la distribución geográfica de las especies del subgénero *Nyssorhynchus* en el territorio Colombiano se ha basado principalmente en la identificación de la hembra utilizando las claves morfológicas, las cuales han sido diseñadas con especímenes recolectados en Centroamérica y otros países de Suramérica. Por este hecho, es importante la



Figura 1. Sitio de colección de los especímenes incluidos en el estudio: Puerto Anchica, Montelibano, Córdoba, Colombia.

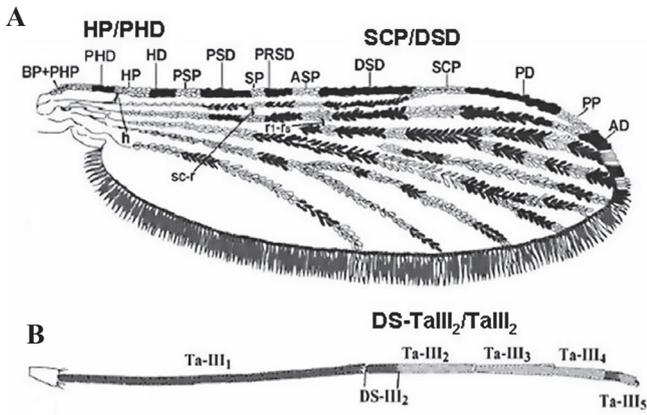


Figura 2. Relaciones morfométricas evaluadas en los especímenes. A. Relaciones del ala: HP/PHD, SCP/DSD. B. Relación de la pata posterior: DS-TaIII₂/TaIII₂. Modificado de Fajardo *et al.* (2008).

realización de trabajos como el presente, que evalúen las relaciones morfométricas consideradas diagnósticas de especies, sobre todo en aquellos anofelinos que como *A. nuneztovari*, presentan una alta variabilidad morfológica y solapamiento con otras especies relacionadas filogenéticamente.

La alta variabilidad morfológica encontrada en especímenes *A. nuneztovari* de Puerto Anchica es similar a lo reportado en otras localidades de Antioquia (Calle *et al.* 2002), Córdoba (Fajardo *et al.* 2008), Venezuela (Delgado y Rubio-Palis 1992; Rubio-Palis 2000) y otras regiones de Latinoamérica (Faran y Linthicum 1981). Esta variabilidad intraespecífica y similitud interespecífica conlleva a los problemas de identificación reportados para esta especie.

El análisis comparativo de los especímenes de Puerto Anchica utilizando los patrones definidos por Fajardo *et al.* (2008) para mosquitos *A. nuneztovari* recolectados en Tierralta, municipio vecino a Montelíbano (datos no mostrados), proporcionaron un panorama orientador de las variaciones que podrían estar presentes en los especímenes de Puerto Anchica. De acuerdo con ello, el 90% de los mosquitos corresponderían a *A. nuneztovari*, y el 10% restante posiblemente se identificarían erróneamente como otras especies del Grupo Oswaldoi. Fajardo *et al.* (2008) también definieron siete patrones morfológicos para la hembra de *A. nuneztovari*, basándose fundamentalmente en la presencia o ausencia de manchas claras y oscuras en la vena Costa del ala y con ellos establecieron los rangos para las tres relaciones en cada uno de los patrones descritos. Basados en la descripción de estos patrones, el 80% de los especímenes de Puerto Anchica identificados como *A. nuneztovari*, corresponderían al patrón I, que los autores definieron como el patrón estándar definido por Faran (1981) y Wilkerson y Peyton (1990), y el 20% restante corresponderían al patrón III, caracterizado por una mancha proximal de mayor tamaño que el patrón I, dado que corresponde a la fusión de las manchas Sectorial Clara (SP), Sectorial Oscura Proximal (PRSD) y el Sector Claro Accesorio (ASP); fusión que se denomina Sectorial Oscura Distal (DSD). Lo anterior, demuestra una vez más, la utilidad de la caracterización de las variaciones morfológicas para permitir una identificación más precisa.

La identificación de los especímenes usando caracteres morfológicos indicó la presencia de varias especies del Grupo Oswaldoi, sin embargo, el análisis molecular permitió la

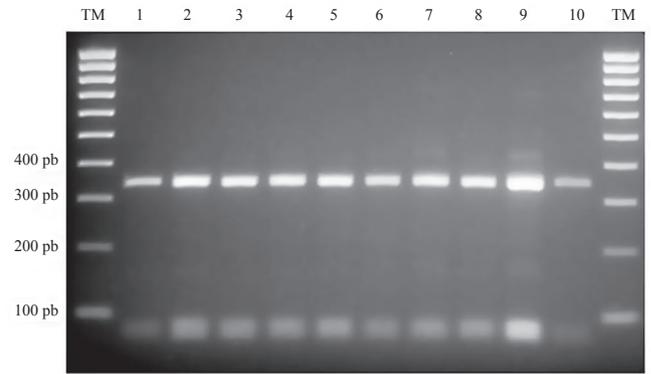


Figura 3. PCR-RFLP-ITS2 para la confirmación de la identidad de los especímenes a especie. Gel de agarosa al 2,5%. Carriles: TM: Marcador de tamaño molecular (pb: pares de bases), 1 y 10: control del patrón de *A. nuneztovari* proveniente de un clon de espécimen de isofamilia con respaldo de secuencia, 2-9: especímenes de Puerto Anchica.

confirmación de todos los especímenes como *A. nuneztovari*, así, los resultados concuerdan con los problemas de identificación reportados con frecuencia en la literatura. Ruiz *et al.* (2005), al confirmar con datos moleculares las identificaciones de especímenes designados como *A. evansae* en el departamento del Putumayo, determinaron la presencia de una nueva especie, denominada *A. benarrochi* B. También, Zapata *et al.* (2007) en la localidad de San Pedro de Urabá, Antioquia, utilizando una prueba molecular, lograron la asignación correcta a especie de especímenes que por claves taxonómicas se identificaban como *A. oswaldoi*, *A. rangeli*, y *A. strodei* Root, 1926, pero su patrón molecular correspondió a *A. nuneztovari*. Esto se presenta en parte porque *A. rangeli* y *A. nuneztovari* son especies hermanas con alta similitud morfológica en la hembra (Faran 1980), lo cual ha conducido a que frecuentemente especímenes de *A. nuneztovari* sean reportados como *A. rangeli*.

Calle *et al.* (2008) implementaron un análisis de morfometría geométrica para diferenciar especies del subgénero *Nyssorhynchus*, entre ellas a *A. nuneztovari*, sin embargo, concluyen que las hembras de *A. oswaldoi* y *A. benarrochi* B sólo pueden ser separadas usando una prueba molecular. Lo anterior, demuestra la pertinencia de conducir análisis moleculares para confirmar la identificación de especies con caracteres morfológicos altamente variables o con similitud morfológica; es posible incluso, que con el uso de estas técnicas en inventarios de especies anofelinas se pueda determinar especies del subgénero *Nyssorhynchus* aún no descritas en el país, como ya se ha demostrado (Ruiz *et al.* 2005). Por el contrario, también es posible descubrir que la diversidad de especies de *Anopheles* es menor a la reportada.

En general, para Colombia se conocen las áreas de distribución de *A. nuneztovari* (Olano *et al.* 2001), y en ellas se presentan diferencias ambientales y ecológicas, como la altitud, precipitación, humedad relativa, vegetación, entre otras (IGAC 2002). Estos factores influyen en la plasticidad fenotípica de los organismos (Anyanwu *et al.* 1997), lo que podría facilitar cambios en su fenotipo como ha sido documentado en los anofelinos (Whitman y Ananthkrishnan 2009; Dujardin *et al.* 2008; Jirakanjanakit *et al.* 2008; Leishnam *et al.* 2008). Caracteres morfométricos como los de alas, pueden evolucionar distintamente: tamaño, proporciones y posiblemente hasta la coloración sufren plasticidad dependiente del

Tabla 1. Identificación morfológica de los especímenes teniendo en cuenta los rangos de las tres relaciones morfométricas reportadas por diferentes autores (n= 41).

Autor	Especie	Porcentaje (%)
Delgado y Rubio-Palis (1993)	<i>A. nuneztovari</i>*	78
	<i>A. nuneztovari</i> / <i>A. rangeli</i>	15
	<i>A. nuneztovari</i> / <i>A. oswaldoi</i>	2
	NP	5
González y Carrejo (2007)	<i>A. nuneztovari</i>	63
	<i>A. nuneztovari</i> / <i>A. rangeli</i>	15
	<i>A. nuneztovari</i> / <i>A. oswaldoi</i>	10
	<i>A. oswaldoi</i>	2
Rubio-Palis (2000)	NP	10
	<i>A. nuneztovari</i>	27
Faran y Linthicum (1981)	NP	73
	<i>A. nuneztovari</i>	24
	<i>A. nuneztovari</i> / <i>A. rangeli</i>	20
	<i>A. rangeli</i>	24
	<i>A. oswaldoi</i>	5
	<i>A. evansae</i>	5
Suárez <i>et al.</i> (1988)	NP	22
	<i>A. nuneztovari</i>	12
	<i>A. oswaldoi</i>	15
	<i>A. rangeli</i>	44
Calle <i>et al.</i> (2002)	NP	29
	<i>A. benarrochi</i>	34
	<i>A. nuneztovari</i> / <i>A. benarrochi</i>	16
	<i>A. benarrochi</i> / <i>A. oswaldoi</i>	12
	<i>A. rangeli</i>	12
	<i>A. nuneztovari</i> / <i>A. rangeli</i>	10
	<i>A. rangeli</i> / <i>A. oswaldoi</i>	2
<i>A. rangeli</i> / <i>A. benarrochi</i> / <i>A. oswaldoi</i>	2	
	NP	12

NP: No fue posible determinar la especie siguiendo los parámetros descritos por los autores. * En negrita se indica la especie más frecuentemente identificada según cada clave.

microambiente; mientras que la forma (sin deformación alométrica), está ampliamente determinada por herencia genética cuantitativa (Dujardin *et al.* 2008). Al respecto, Le Sueur *et al.* (1992), encontraron que *A. merus* Donitz, 1902, una especie del complejo Gambiae, presentó variación alométrica entre las manchas claras y oscuras dependiendo de la temperatura.

Adicionalmente, es posible que la significancia evolutiva y taxonómica de los tamaños de las manchas en el ala no sean proporcionales a su conformación geométrica ya que estas estructuras son efecto directo del número de células y posiblemente tienen una determinación embriológica más controlada, mientras que las manchas son producto de la distribución de pigmentos (Edwards *et al.* 2007). Datos preliminares indican que en *A. nuneztovari* las coloraciones alares y tarsales varían entre generaciones próximas (Trujillo *et al.* 2005), lo cual sugiere que estas manchas no son caracteres muy confiables para la identificación de *A. nuneztovari*. Otro aspecto que puede influir, es el efecto de procesos microevolutivos,

según los cuales, el tamaño, la forma y quizás la coloración pueden cambiar en pocos años (Jirakanjanakit *et al.* 2008); por lo tanto, las claves morfológicas que fueron de utilidad años atrás, en la actualidad pueden ser no válidas.

Teniendo en cuenta que los vectores de malaria en Colombia, entre ellos *A. nuneztovari*, tienen una amplia distribución en regiones con diferentes condiciones climáticas y ambientales (Gutiérrez *et al.* 2009; Olano *et al.* 2001), el entendimiento de los factores que influyen la plasticidad fenotípica de mosquitos *Anopheles* sería de gran relevancia para establecer la utilidad y el valor predictivo que posee la caracterización de relaciones morfométricas para la identificación taxonómica de especies altamente relacionadas.

Conclusiones

Este trabajo, basado en el análisis de las relaciones morfométricas de especímenes de *A. nuneztovari* y de una estrategia de identificación molecular, permitió mostrar la alta varia-

Tabla 2. Comparación entre el rango obtenido para los especímenes *A. nuneztovari* de Puerto Anchica y los reportados para esta especie en la literatura.

Relación morfológica	Puerto Anchica	Rangos reportados en la literatura					
		Faran y Linthicum (1981)	Suárez <i>et al.</i> (1988)	Delgado y Rubio-Palis (1993)	Rubio-Palis (2000)	Calle <i>et al.</i> (2002)	González y Carrejo (2007)
DS-TaIII2/TaIII2	0,13-0,34	0,20-0,32	0,25-0,35	0,11-0,44	0,24-0,35	0,25-0,35	0,21-0,42
HP/PHD	0,64-2,60	0,70-1,70	0,70-1,70	0,60-4,50	0,70-4,50	1,20-2,30	0,44-4,00
SCP/DSD	0,28-0,68	0,20-0,55	≤0,49	0,30-0,73	≤0,49	0,36-0,71	0,21-0,71

ción morfológica que presenta esta especie en una localidad colombiana. Es importante realizar trabajos futuros usando herramientas como la morfometría geométrica y estrategias moleculares para analizar el grado de variabilidad morfológica y genética de los especímenes de *A. nuneztovari* a lo largo de su rango de distribución.

Los resultados sugieren que las claves morfológicas propuestas por Delgado y Rubio-Palis (1993) y González y Carrejo (2007) son las más convenientes para lograr la identificación correcta de los especímenes de *A. nuneztovari*. Así mismo, cuando se encuentren dentro de los ejemplares muestreados especímenes del Grupo Oswaldoi, se sugiere recurrir a las pautas reportadas por Fajardo *et al.* (2008). El problema que se ha presentado durante años, relacionado con la identificación de los miembros del subgénero *Nyssorhynchus* y en particular aquellos del Grupo Oswaldoi, podría reducirse con el desarrollo de estudios en los que se apliquen herramientas como la morfometría geométrica, la cual ha demostrado ser exacta y precisa en la asignación de especie, e inclusive se propone que a futuro se utilicen “claves métricas” y programas informáticos para facilitar su determinación. Igualmente, se plantea la implementación de herramientas moleculares debidamente estandarizadas que permitan confirmar la especie en casos problemáticos.

Agradecimientos

Agradecemos a J.J. González y M.I. Castro de la Unidad de Entomología, Laboratorio de Salud Pública, Secretaría de Salud Departamental, Córdoba, por la cooperación que hizo posible la recolección de especímenes. Este trabajo fue derivado de proyectos financiados por el Comité para el Desarrollo de la Investigación - CODI, Universidad de Antioquia (códigos 8700-1416 y 8700-039, a MMC). Se agradece al Programa Jóvenes Investigadores CODI-UdeA por el apoyo a GFGG.

Literatura citada

ALAM, M. T.; DAS, M. K.; DEV, V.; ANSARI, M. A.; SHARMA, Y. D. 2007. Identification of two cryptic species in the *Anopheles (Cellia) annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP. *Parasitology Research* 100: 943-948.

ANYANWU, G. I.; DAVIES, D. H.; MOLYNEUX, D. H.; PHILLIPS, A. 1997. Variation in cuticular hydrocarbons among strains of *Anopheles (Cellia) stephensi* Liston possibly related to prior insecticide exposure. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91: 649-659.

ARRUDA, M.; CARVALHO, M. B.; NUSSENZWEIG, R. S.; MARACIC, M.; FERREIRA A. W.; COCHRANE, A. H. 1986. Potential vectors of malaria and their different susceptibility to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in northern Brazil identified by immuno-assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 873-881.

BEEBE, N. W.; SAUL, A. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 478-481.

BROCHERO, H.; QUIÑONES, M. L. 2008. Retos de la entomología médica para la vigilancia en salud pública en Colombia: reflexión para el caso de malaria. *Biomédica* 28 (1): 18-24.

CALLE, D. A.; QUIÑONES, M. L.; ERAZO, H. F.; JARAMILLO, N. 2002. Morphometric discrimination of females of five species of *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus* from southern and northwest Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 1191-1195.

CALLE, D. A.; QUIÑONES, M. L.; ERAZO, H. F.; JARAMILLO, N. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles (Nyssorhynchus)* presentes en Colombia. *Biomédica* 28: 371-385.

CHEN, B.; BUTLIN, R. K.; PEDRO, P. M.; WANG, X. Z.; HARBACH, R. E. 2006. Molecular variation, systematics and distribution of the *Anopheles fluviatilis* complex in southern Asia. *Medical and Veterinary Entomology* 20 (1): 33-43.

CIENFUEGOS, A.; CÓRDOBA, L.; GÓMEZ, G.; LUCKHART, S.; CONN, J.; CORREA, M. 2008. Diseño y evaluación de metodologías basadas en PCR-RFLP de ITS2 para la identificación molecular de mosquitos *Anopheles* spp. (Diptera: Culicidae) de la Costa Pacífica de Colombia. *Revista Biomédica* 19 (1): 35-44.

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.

COLLINS, F. H.; KAMAU, L.; RANSON, H. A.; VULULE, J. M. 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization* 78 (12): 1412-1423.

DELGADO, N.; RUBIO-PALIS, Y. 1992. Morphometric characterization of the malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from western Venezuela. *Mosquito Systematics* 24: 231-241.

DELGADO, N.; RUBIO-PALIS, Y. 1993. Identification of *Anopheles (Nyssorhynchus)* (Diptera: Culicidae) occurring in Western Venezuela. *Mosquito Systematics* 25 (3): 222-230.

DUJARDIN, J. P. 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 875-890.

EDWARDS, K. A.; DOESCHER, L. T.; KANESHIRO, K. Y.; YAMAMOTO, D. 2007. A database of wing diversity in the Hawaiian *Drosophila*. *PLoS One* 2 (5): 487.

ELLIOT, R. 1972. The influence of vector behavior on malaria transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 21: 755-763.

FAJARDO, M.; GONZÁLEZ, R.; FIDEL, M.; LÓPEZ, D.; WILKERSON, R.; SALLUM, M. A. 2008. Morphological analysis of three populations of *Anopheles (Nyssorhynchus) nuneztovari* Gabaldón (Diptera: Culicidae) from Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103 (1): 85-92.

FARAN, M. E. 1980. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXXIV. A revision of the Albimanus section of the subgenus *Nyssorhynchus* of *Anopheles*. *Contributions of the American Entomological Institute* 15: 1-214.

- FARAN, M. E.; LINTHICUM, K. J. 1981. A handbook of the Amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics 13: 1-81.
- FERNÁNDEZ, R.; SCHOELER, G.; STANCIL, J. 2004. Presencia de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* en áreas de selva con transmisión malarica. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública 21 (4): 217-222.
- FLORES-MENDOZA, C.; PEYTON, E.; WILKERSON, R.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 2004. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *konderi* Galvão and Damasceno: neotype designation and resurrection from synonymy with *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *oswaldoi* (Diptera: Culicidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington 106: 118-132.
- FRITZ, G.; ENGMAN, S.; RODRIGUEZ, R.; WILKERSON, R. 2004. Identification of four vectors of human *Plasmodium* spp. by multiplex PCR: *Anopheles rangeli*, *An. strodei*, *An. triannulatus*, and *An. trinkae* (Diptera: Culicidae: *Nyssorhynchus*). Journal of Medical Entomology 41: 1111-1115.
- GARROS, C.; KOEKEMOER, L. L.; KAMAU, L.; AWOLOLA, T. S.; VAN BORTEL, W.; COETZEE, M.; COOSEMANS, M.; MANGUIN, S. 2004. Restriction fragment length polymorphism method for the identification of major African and Asian malaria vectors within the *Anopheles funestus* and *An. minimus* groups. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 70 (3): 260-265.
- GOBERNACIÓN DE CÓRDOBA. 2008. Situación epidemiológica del programa de enfermedades transmitidas por vectores. Secretaría de desarrollo de la salud, Montería, Córdoba, Colombia. 19 p.
- GONZÁLEZ, R.; CARREJO, N. 2007. Introducción al estudio taxonómico de *Anopheles* de Colombia: claves y notas de distribución. Universidad del Valle, Cali, Colombia. 237 p.
- GUTIÉRREZ, L. A.; NARANJO, N.; JARAMILLO, L. M.; MUSKUS, C. M.; 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.
- GUTIÉRREZ, L. A.; GONZÁLEZ, J. J.; CASTRO, M. I.; GÓMEZ, G. F.; ROSERO, D. A.; LUCKHART, S.; CONN, J. E.; CORREA, M. M. 2009. Species composition and natural infectivity of anthropophilic *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in states of Córdoba and Antioquia, Northwestern Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104 (8): 1117-1124.
- HAYES, J.; CALDERON, G.; FALCON, R.; ZAMBRANO, V. 1987. Newly incriminated anopheline vectors of human malaria parasites in Junin Department, Peru. Journal of American Mosquito Control Association 33: 418-422.
- HRIBAR, L. J. 1994. Geographic variation of male genitalia of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics 26: 132-144.
- HRIBAR, L. J. 1995. Costal wing spot variations within and among progeny of single female *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). Mosquito Systematics 27: 1-10.
- INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS MEDIOAMBIENTALES (IDEAM). 2008. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co>. Fecha última revisión: 1 octubre 2008.
- INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI (IGAC). 2002. Atlas de Colombia. Bogotá. Diccionario geográfico de Colombia. Bogotá, Colombia. 342 p.
- INSTITUTO NACIONAL DE SALUD –INS. SIVIGILA. 2007. Boletín Epidemiológico. Semana Epidemiológica 52. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/vigilancia/nivel2.php?seccion=34>. Fecha última revisión: 2 septiembre 2008.
- JIRAKANJANAKIT, N.; LEEMINGSAWAT, S.; DUJARDIN J. P. 2008. The geometry of the wing of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* in isofemale lines through successive generations. Infection, Genetics and Evolution 8: 414-421.
- LE SUEUR, D.; SHARP, B. L.; APPLETON, C. C. 1992. Dark-scaled areas on adult *Anopheles* mosquitoes are selectively affected by temperature-related size variation. Medical and Veterinary Entomology 6: 396-398.
- LEISNHAM, P. T.; SALA, L. M.; JULIANO, S. A. 2008. Geographic variation in adult survival and reproductive tactics of the mosquito *Aedes albopictus*. Journal of Medical Entomology 45 (2): 210-221.
- LI, C.; WILKERSON, R. C. 2005. Identification of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* complex species (Diptera: Culicidae) using rDNA ITS2-based PCR primers. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100: 495-500.
- MARRELLI, M. T.; SALLUM, M. A.; MARINOTTI, O. 2006. The second internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA as a tool for Latin American anopheline taxonomy: a critical review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101: 817-832.
- MATSON, R.; RIOS, C. T.; CHAVEZ, C. B.; GILMAN, R. H.; FLORIN, D.; SIFUENTES, V. L.; GREFFA, R. C.; YORI, P. P.; FERNANDEZ, R.; PORTOCARRERO, D. V.; VINETZ, J. M.; KOSEK, M. 2008. Improved molecular technique for the differentiation of neotropical anopheline species. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 78 (3): 492-498.
- MIRABELLO, L.; CONN, J. E. 2008. Population analysis using the nuclear white gene detects Pliocene/Pleistocene lineage divergence within *Anopheles nuneztovari* in South America. Medical and Veterinary Entomology 22: 109-119.
- NORRIS, D. E. 2002. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. International Journal for Parasitology 32 (13): 1607-1615.
- OLANO, V.; BROCHERO, H.; SÁENZ, R.; QUIÑONES, M.; MOLINA, J. 2001. Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. Biomédica 21: 402-408.
- PÉREZ, L.; SUÁREZ, M.; MURCIA, L.; DE LA HOZ, F.; OLANO, V. A.; BROCHERO, H. 1999. La malaria en el Amazonas conocimientos, prácticas, prevalencia de parasitemia y evaluación entomológica en mayo de 1997. Biomédica 19: 93-102.
- QUIÑONES, M. L.; SUÁREZ, M. F.; FLEMING, G. A. 1987. Distribución y bionomía de los anofelinos en la Costa Pacífica de Colombia. Colombia Médica 16: 19-24.
- RUBIO-PALIS, Y. 2000. *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) de Venezuela: taxonomía, bionomía, ecología e importancia médica. Escuela de Malariología y Saneamiento Ambiental “Doctor Arnoldo Gabaldon”. Maracay, Venezuela. 118 p.
- RUIZ, F.; QUIÑONES, M. L.; ERAZO, H.; CALLE, D.; ALZATE, J.; LINTON, Y. M. 2005. Molecular differentiation of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* and *An. (N.) oswaldoi* from Southern Colombia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100: 155-160.
- SALLUM, M. A.; BERGO, E. S.; FLORES, D. C.; FORATTINI, O. P. 2002. Systematic studies on *Anopheles galvaoi* Causey, Deane & Deane from the subgenus *Nyssorhynchus* blanchard (Diptera: Culicidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97 (8): 1177-1189.
- SALLUM, M. A.; MARRELLI, M. T.; NAGAKI S. S.; LAPORTA G. Z.; DOS SANTOS, C. L. 2008. Insight into *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (Diptera: Culicidae) species from Brazil. Journal of Medical Entomology 45 (6): 970 -981.
- SCARPASSA, V. M.; TADEI, W. P.; SUÁREZ, M. F. 1999. Population structure and genetic divergence in *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Brazil and Colombia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 60 (6): 1010-1018.
- SUÁREZ, M. F.; QUIÑONES, M. L.; ROBAYO, M. A. 1988. Clave para la determinación taxonómica de larvas y adultos hembras de los principales anofelinos de Colombia. Ministerio de Salud, Bogotá, Colombia. 49 p.
- TADEI W. P.; DUTARY, T. B.; SANTOS, J.; SCARPASSA, V.; RODRIGUES, I. B.; SILVA, R. M. 1998. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 59 (2): 325-335.

- TRUJILLO, A.; AGUDELO, O.; MOLINA, P.; MORENO, M.; ZAPATA, M.; LUCKHART, S.; CORREA, M. 2005. Análisis de PCR-RFLP del espaciador interno transcrito ITS1 y caracterización de las variaciones morfológicas de isofamilias de *Anopheles nuneztovari*, San Pedro de Urabá, 2004. Laboratorio Actual 38: 81.
- VAN BORTEL, W.; HARBACH, R. E.; TRUNG, H. D.; ROELANTS, P.; BACKELJAU, T.; COOSEMANS, M. 2001. Confirmation of *Anopheles varuna* in Vietnam previously misidentified and mistargeted as the malaria vector *Anopheles minimus*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 65: 729-732.
- WHITMAN, D. W.; ANANTHAKRISHNAN, T. N. 2009. Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences. Science Publishers, Enfield, NH, USA. 904 p.
- WILKERSON, R. C.; PEYTON, E. L. 1990. Standardized nomenclature for the costal wing spots of the genus *Anopheles* and other spotted-wing mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology 27: 207-224.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2003. Malaria entomology and vector control. Learner's guide. Geneva: WHO. 109 p.
- ZAPATA, M. A.; CIENFUEGOS, A. V.; QUIRÓS, O. I.; QUIÑONES, M. L.; LUCKHART, S.; CORREA, M. M. 2007. Discrimination of seven *Anopheles* species from San Pedro de Urabá, Antioquia, Colombia, by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of ITS sequences. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 77 (1): 67-72.

Recibido: 18-may-2009 • Aceptado: 20-feb-2010