

Taxonomía molecular de mosquitos

Leonardo M. **Díaz-Nieto**¹

Clara I. **Berrón**²

Arnaldo **Maciá**³

Corina M. **Berón**¹

¹Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC) - CONICET y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA). Mar del Plata, Buenos Aires.

²Laboratorio de Virología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral y CONICET. Santa Fe, Santa Fe.

³División Entomología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata y Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC). La Plata, Buenos Aires.

leomdn@gmail.com

clara.berron@gmail.com

arnaldo_macia@fcnym.unlp.edu.ar

cberon@fiba.org.ar

La correcta identificación de las especies es fundamental en los estudios de biología y otras ciencias relacionadas. En la actualidad, la taxonomía de culícidos basada en las características anatómicas y morfológicas externas, es la más aceptada y utilizada al momento de determinar la especie a la que pertenece un mosquito. Sin embargo, la identificación taxonómica sustentada en la observación de los caracteres morfológicos, suele ser dificultosa y limi-

tada al bajo número de expertos que se dedican a esta área del conocimiento. Como alternativa y/o complemento a la identificación morfológica, desde hace algunos años se utilizan metodologías químicas y moleculares. Entre ellas, los sistemas de identificación basados en análisis de secuencias nucleotídicas del ácido desoxirribonucleico (DNA) son los más conocidos y extensamente aplicados. En particular, para especies de mosquitos fueron propuestos numerosos genes como unidad de análisis para la discriminación de entidades taxonómicas, y actualmente se está estudiando y discutiendo la utilidad de los mismos. A partir de estos genes se han generado numerosos cebadores capaces de amplificar, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, secuencias totales o parciales, que son posteriormente secuenciadas y analizadas. Entre ellos, se destacan cebadores capaces de amplificar fragmentos del gen de la subunidad ribosomal pequeña eucariota 18S, secuencias correspondientes a los espacios transcritos internos, a la región 5' del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I y microsatélites. Hasta la fecha, los estudios de taxonomía molecular con especies de mosquitos de Argentina son muy escasos, solo algunos trabajos recientes analizan y discuten resultados obtenidos a partir de secuencias parciales de algunos de los genes anteriormente mencionados. En este capítulo se lleva a cabo una revisión de los diferentes genes que fueron utilizados para la identificación molecular de distintas especies de mosquitos y, en particular, de los que fueron utilizados para la identificación de especies presentes en Argentina. Finalmente, se discute la utilidad de estas técnicas y se describen las ventajas y desventajas de las mismas respecto de la taxonomía basada en caracteres morfológicos.

Herramientas moleculares para la identificación de mosquitos

Identificar correctamente una especie es primordial en las ciencias biológicas y, en particular, la taxonomía de culícidos merece una especial atención debido a la capacidad que poseen estos insectos de vehicular diversos patógenos, que causan enfermedades en humanos y otros vertebrados (Harbach, 2007; Becker *et al.*, 2010). Los métodos de identificación de especies basados en la observa-

ción de caracteres morfológicos son los más antiguos y más usados en la actualidad. Estos métodos se basan tradicionalmente en claves dicotómicas, que son construidas a partir de las características morfológicas, observadas en una etapa específica del ciclo de vida de los mosquitos (Munstermann y Conn, 1997). La identificación morfológica de estos insectos a menudo se ve obstaculizada por la varia-

ción intraespecífica, la complejidad de algunos de los caracteres y la necesidad de que las muestras se encuentren en excelente estado de conservación (Zavortink, 1974; Cywinska *et al.*, 2006). Por otro lado, existen complejos de especies que incluyen taxones con diferencias profundas en cuanto a su capacidad vectorial. Algunos de ellos, por lo tanto, pueden vectorizar una enfermedad, mientras que otros miembros del complejo, morfológicamente indistinguibles, no son vectores eficientes. Tal es el caso de los complejos *Anopheles (Cellia) funestus* Giles (Koekemoer *et al.*, 2002) y *Anopheles (Cellia) gambiae* Giles (Coetzee *et al.*, 2013). Las especies que integran dichos complejos solo pueden diferenciarse a través de su bionomía o con la asistencia de técnicas moleculares, y su distinción es de capital importancia para la epidemiología.

Años atrás, los métodos moleculares comenzaron a desempeñar un papel importante en la sistemática tradicional de mosquitos (Munstermann, 1995). Las etapas iniciales de este movimiento se resumieron en una conferencia realizada en Liverpool, Gran Bretaña, que generó como resultado un volumen llamado *Biosystematics of Haematophagous Insects* (Schofield, 1988). En esta publicación se describen diversas técnicas moleculares que permiten determinar especies crípticas a través de sondas de DNA, claves dicotómicas bioquímicas para especies de difícil identificación, así como aplicaciones y limitaciones de los análisis de hidrocarburos cuticulares, para la diferenciación taxonómica de especies. En los años siguientes, los métodos y el número de especies analizadas aumentaron geométricamente (Munstermann y Conn, 1997).

Entre los métodos moleculares actuales utilizados para la identificación de mosquitos podemos mencionar la hibridación genómica, la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP), las isoenzimas y la secuenciación de fragmentos específicos de DNA. De todos estos, los sistemas de identificación basados en análisis de secuencias nucleotídicas de DNA son los más conocidos y extensamente aplicados. Estas metodologías surgieron en la década de 1980 con la aparición de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) (Mullis *et al.*, 1986). En la actualidad las bases de datos públicas (como el *Genbank* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank, entre otras) incorporan secuencias en forma permanente.

La principal ventaja que poseen estos métodos con respecto a la identificación morfológica radi-

ca en que no es necesario contar con un ejemplar con sus caracteres morfológicos perfectamente conservados, ni tampoco con la totalidad del individuo, ya que una parte del ejemplar basta como muestra para poder llevar a cabo su identificación molecular. Sí es requerimiento indispensable que su DNA genómico se encuentre bien conservado. El incremento del diseño y aplicación de distintos marcadores moleculares ha facilitado la identificación precisa de las especies de mosquitos, particularmente dentro del grupo de especies crípticas. Por ejemplo, *Anopheles lesteri* Baisas y Hu y *Anopheles sinensis* Wiedemann, pueden identificarse rápidamente y de manera cierta usando secuencias intergénicas ITS2 sin necesidad de utilizar sus caracteres morfológicos (Phuc *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004).

En el presente capítulo se describirán los marcadores moleculares basados en las secuencias de DNA más usadas para la identificación molecular de mosquitos, entre los que se encuentran el gen mitocondrial COI, los genes ribosomales 18S RNAr y 28S RNAr, las regiones intergénicas transcritas ITS (ITS1, 5.8S RNAr y ITS2), el *locus* acetilcolinesterasa-2 (*ace-2*), microsátélites, la amplificación aleatoria de DNA polimórfico y los espaciadores intergénicos (IGS). Sobre el final se puntualizarán los estudios realizados con especies de distribución en Argentina.

Gen mitocondrial citocromo oxidasa c subunidad I (COI)

Hebert *et al.* (2003) propusieron un sistema de identificación de las especies animales basado en la utilización de un segmento estandarizado de 648 pares de bases (pb) del gen mitocondrial COI. Entre otras ventajas, se halló experimentalmente que la variación de las secuencias a nivel interespecífico era mayor que a nivel intraespecífico, por lo cual podrían utilizarse para distinguir especies. A partir de ese año se publicaron numerosos estudios que probaron la utilidad de dicho fragmento, que fue llamado código de barra genético (CBG), para identificar a las especies animales de diferentes grupos taxonómicos, como peces y aves (Ward *et al.*, 2005; Kerr *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2009). El primer trabajo realizado para comprobar la utilidad de los CBG para diferenciar especies pertenecientes a la familia Culicidae, fue realizado a partir de secuencias procedentes de mosquitos del este de Canadá (Cywinska *et al.*, 2006). En el mismo se encontró que los CBG fueron efectivos para diferenciar las especies de mosquitos previamente reconocidas por la taxonomía tradicional, dado que la divergencia entre especies congénicas fue casi 20 veces mayor a la diver-

gencia encontrada entre individuos de la misma especie. Asimismo, se sugirió que al aumentar el número de taxones y ampliar la cobertura geográfica, las conclusiones del trabajo no se alterarían debido a que el sistema había sido probado exitosamente con secuencias COI obtenidas de las bases de datos públicas de especies de mosquitos procedentes de otras regiones del mundo. Los bancos de secuencias génicas, tales como *GenBank*, son colecciones de secuencias nucleotídicas que son depositadas por los usuarios y que están disponibles en forma gratuita en internet.

Al año siguiente se publicó un nuevo trabajo donde se evaluó la efectividad de los CBG para identificar especies de culícidos en India; de un total de 63 especies, solo dos pertenecientes al subgénero *Ochlerotatus* no pudieron diferenciarse (Kumar *et al.*, 2007). Wang *et al.* (2012) determinaron que utilizando los CBG se lograban distinguir 122 especies de mosquitos de China, ya que todas ellas presentaron un grupo de secuencias COI que lograba diferenciarlas. La divergencia en las secuencias fue 30 veces mayor entre especies congénicas que entre individuos de la misma especie. Chan *et al.* (2012) observaron que, de un total de 45 especies de mosquitos de Singapur, el cien por ciento fue identificada con éxito por los CBG, por lo cual concluyeron que era una herramienta útil para complementar la identificación de los culícidos basada en sus caracteres morfológicos. Además de los trabajos mencionados, cuya finalidad general fue probar la utilidad de los CBG para diferenciar especies que comparten su distribución, se realizaron trabajos más específicos para probar si los CBG funcionaban para diferenciar especies muy similares morfológicamente o isomórficas. En Sudamérica tropical, los CBG lograron diferenciar *Anopheles dunhami* Causey (Ruiz *et al.*, 2010), *Anopheles calderoni* Wilkerson (González *et al.*, 2010), *Anopheles pholidotus* Zavortink (Harrison *et al.*, 2012) y especies del grupo *Albitarsis* (Ruiz-Lopez *et al.*, 2012). Demari-Silva *et al.* (2011) utilizaron un fragmento de 475 pb del gen COI, que incluyó parte de una región del CBG, para diferenciar 17 especies del género *Culex* de Brasil. Este género incluye especies muy similares entre sí, a veces solo distinguibles con precisión mediante el análisis de estados inmaduros y de la genitalia de los machos adultos. En general, las secuencias fueron útiles para diferenciar las especies, excepto en algunos casos: *Culex usquatus* y *Culex coronator* presentaron un solapamiento de secuencias de acuerdo a la topología de los árboles

filogenéticos obtenidos al analizar los datos con el programa bioinformático Mr. Bayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2000), mientras que dos pares de especies presentaron muy bajas divergencias interespecíficas: *Culex bidens* - *Culex declarator* y *Culex aliciae* - *Culex dyius* Root. En Singapur, los CBG fueron útiles para diferenciar *Aedes (Aedimorphus) vexans* (Meigen) y *Ochlerotatus (Empihals) vigilax* (Skuse), *Culex vishnui* Theobald y *Culex pseudo-vishnui* Colless, *Lutzia fuscaza* (Wiedemann) y *Lutzia (Metalutzia) halifaxii* (Theobald) y *Aedes (Stegomyia) albopictus* y *Aedes (Stegomyia) malayensis* (Colless) (Chan *et al.*, 2014). En otros trabajos los CBG han sido útiles para encontrar diversidad oculta en algunas especies de mosquitos. Por ejemplo, Demari-Silva *et al.* (2011) hallaron una alta divergencia intraespecífica en *Culex dolosus*, *Culex mollis* y *Culex imitator* que, al asociarse con diferencias morfológicas observadas en larvas, pupas y machos adultos, sugirieron que estas especies verdaderamente conformarían complejos de especies. Linton *et al.* (2013) desarrollaron un estudio en la Amazonia oriental ecuatoriana, con el objetivo de conocer la diversidad de mosquitos. La obtención de los CBG de los especímenes capturados descubrió y confirmó nuevas especies, debido al aumento de las bases de datos de los CBG, por lo cual los autores recomendaron un enfoque sistemático integrado en futuros estudios sobre biodiversidad. Chan *et al.* (2014) reconocieron distintos morfotipos de la especie *An. sinensis* al asociar la alta divergencia intraespecífica con diferencias encontradas en la venación de las alas de esta especie de mosquito. Gunay *et al.* (2015) también encontraron diversidad oculta en mosquitos del género *Culex* de Turquía utilizando los CBG. Este estudio reveló que *Culex (Neoculex) territans* Walker comprende en realidad a dos especies, ninguna de las cuales es *Cx. territans* s. s. (es decir la especie que se identifica a través de la morfología), sino que se trata de *Culex (Neoculex) impudicus* Ficalbi y otra especie desconocida. Asimismo, el análisis detallado del grupo *Piapiens*¹ reveló la existencia de *Culex pipiens*, *Culex pipiens* f. *molestus* y *Culex quinquefasciatus* en los ejemplares analizados por estos autores. De esta forma, los CBG contribuyeron a ampliar la lista de mosquitos *Culex* de Turquía a 15 especies reconocidas además de *Cx. pipiens* f. *molestus*.

Adicionalmente, las secuencias COI se han utilizado para analizar la genética de poblaciones de especies vectores. Jaramillo *et al.* (2011) encontraron una baja diferenciación genética entre las pobla-

¹ El estatus taxonómico de *Culex pipiens* es tratado en forma diferente en la bibliografía que se cita. El objetivo de este capítulo no es discutir las controversias relacionadas con ese problema, para lo cual recomendamos consultar el trabajo de Harbach (2012).

ciones del vector de plasmodios *Anopheles nuneztovari* s. l. ubicadas en distintas localidades de los departamentos de Antioquia y Córdoba en Colombia, sugiriendo que existe flujo génico entre estas poblaciones. Rajavel *et al.* (2015) utilizaron los CBG, conjuntamente con el análisis de caracteres morfológicos y morfométricos de larvas, pupas y adultos, para determinar si *Culex tritaeniorhynchus* Giles, un importante vector del virus de la Encefalitis Japonesa en India, pertenecía a un único taxón. Según el análisis de las secuencias COI, las poblaciones de *Cx. tritaeniorhynchus* de India pertenecen todas a la misma especie, ya que se agruparon en un único clado taxonómico. Esto concuerda con los resultados morfológicos, que también denotaron que todas las poblaciones analizadas pertenecen a un único taxón. Por último, los CBG se han utilizado en algunos casos para establecer relaciones filogenéticas. Demari-Silva *et al.* (2011) hallaron que el subgénero *Culex* es parafilético en relación al subgénero *Phenacomyia*, ya que ambos se agruparon en un mismo clado. Lo mismo sucedió con el género *Lutzia* en relación al género *Culex*. Ambos resultados se contraponen con trabajos previos realizados en base a caracteres morfológicos, por lo cual los autores concluyeron que deberían realizarse nuevos estudios para definir la posición de *Phenacomyia* y *Lutzia* en la filogenia, incluyendo un mayor número de muestras e información de genes nucleares.

Genes ribosomales

En eucariotas el ácido ribonucleico ribosómico (RNAr) es una familia multigénica organizada en unidades repetidas o en tándem dentro de una región organizadora nuclear. Cada unidad repetida contiene los genes 18S, 5.8S y 28S RNAr que son regiones conservadas y poco variables, intercaladas por regiones más variables de espaciadores no codificantes, los espaciadores internos ITS-1 e ITS-2 (Hillis y Dixon, 1991; Polanco *et al.*, 1998).

El RNAr ha sido bien estudiado por más de seis décadas (Noller, 2005), con intereses que van desde la industria farmacéutica e investigaciones bioquímicas a los estudios biológicos comparativos. Estos estudios han logrado una gran cantidad de información a nivel estructural y funcional y sobre las características evolutivas de estas moléculas. En la actualidad se puede encontrar un gran número de secuencias de genes RNAr en las bases públicas de datos genéticos. En particular, los estudios filogenéticos se han propagado rápidamente, debido a la universalidad de la presencia de este gen en los organismos y a su alto número de copias por célula, lo que facilita su amplificación y secuenciación (Gillespie *et*

al., 2006). Las características de esta familia de genes los hacen altamente favorables para estudios de sistemática. Ciertas regiones del RNAr evolucionan rápidamente, mientras que otras regiones se mantienen altamente conservadas, permaneciendo sin cambios incluso en organismos muy alejados evolutivamente (Beckingham, 1982).

18S RNAr

El gen 18S RNAr es un componente de la subunidad pequeña del ribosoma eucariótico 40S. Las secuencias obtenidas a partir de este gen han sido usadas exitosamente para examinar relaciones evolutivas entre especies, géneros y altos niveles taxonómicos de diferentes insectos (Maddison *et al.*, 1999; Aransay *et al.*, 2000; Beebe *et al.*, 2000a; b). En general, los análisis completos del gen 18S RNAr son congruentes y apoyan las relaciones filogenéticas obtenidas a partir de estudios basados en caracteres morfológicos (por ejemplo: Wiegmann, 1994; Sorensen *et al.*, 1995; Whiting *et al.*, 1997). En particular para mosquitos, los análisis de las secuencias de este gen fueron eficientes para diferenciar elevadas jerarquías taxonómicas, pero en algunos casos tuvieron limitaciones para evaluar las relaciones filogenéticas entre ellas.

Miller *et al.* (1997) analizaron divergencias en las secuencias ribosomales 18S y 5.8S del infraorden Culicomorpha. Los análisis filogenéticos generados a partir de estas secuencias ubicaron a los culícidos en un grupo monofilético, en concordancia con la clasificación basada en la morfología de larvas y adultos. A partir de estos análisis los autores también pudieron observar la cercanía que poseen los culícidos con las familias Chaoboridae y Corethrellidae y que la subfamilia Anophelinae forma un grupo basal con respecto a las subfamilias Toxorhynchitinae y Culicinae. Shepard *et al.* (2006) tuvieron ciertas limitaciones al estudiar las relaciones filogenéticas dentro de la familia Culicidae del noroeste de Estados Unidos en base a secuencias del gen 18S RNAr, obtenidas de 39 especies de mosquitos. Estos autores observaron que, en general, las filogenias obtenidas por alineamientos de las secuencias de este gen, fueron consistentes con la clasificación tradicional basada en caracteres morfológicos, excepto para los géneros *Psorophora* y *Uranotaenia*. Los resultados confirman la posición del género *Anopheles* como taxón hermano de los restantes Culicidae; *Toxorhynchites* estuvo representado como un grupo monofilético hermano distinto de Culicinae; *Psorophora* formó un clado basal con *Culiseta*, *Coquillettidia* y *Culex*, pero también se mostró como un taxón hermano de *Aedes* y *Ochlerotatus*; *Coquille-*

ttidia perturbans se ubicó como un grupo hermano de *Culiseta*. La ubicación de *Uranotaenia* en la filogenia no fue concluyente y pareció ser un grupo hermano de *Aedes* y *Ochlerotatus* o un taxón basal para todos los demás culicinos. Finalmente *Aedes* y *Ochlerotatus* formaron dos clados separados y distintos. De este modo se apoyó la propuesta de Reinert (2000) de elevar al subgénero *Ochlerotatus* a género.

El RNAr es capaz de sufrir una serie de plegamientos dando como resultado la formación de una estructura secundaria que, conjuntamente con otras moléculas, forma parte de los ribosomas. Estas estructuras son fundamentales para la funcionalidad celular, por lo que son muy conservadas a lo largo de la evolución y, en general, son más conservadas que las secuencias de nucleótidos, por lo que incluir esta información en algunos casos puede mejorar la estimación de relaciones filogenéticas. Beebe *et al.* (2000a) realizaron estudios filogenéticos usando alineamientos de secuencias de DNA basados en la estructura secundaria y similitud de las secuencias de las subunidades ribosomales pequeñas nucleares 18S y mitocondriales 12S, con la finalidad de resolver los problemas taxonómicos subsistentes en el grupo de *Anopheles punctulatus* Dönitz. Sus resultados demostraron que las subunidades ribosomales pequeñas 12S fueron altamente restringidas por sus estructuras secundarias y poseían pocas variaciones. En consecuencia, no serían útiles para estudios de especies filogenéticamente cercanas a *An. punctulatus*. El alineamiento estructural de las subunidades ribosomales pequeñas nucleares fue más informativo que sus alineamientos basados en la identidad. Los análisis demostraron que el grupo *Anopheles punctulatus* es monofilético con respecto a los dos clados mayores, *farauti* y *punctulatus*. *Anopheles koliensis* Owen fue posicionado como un grupo basal del clado *farauti*. En este caso la diferenciación fue más eficiente cuando se analizó estructuralmente las secuencias 18S en comparación con el análisis de similitud de las secuencias correspondientes a este gen.

El tamaño de las secuencias analizadas resulta importante para obtener mejores resultados, Barges *et al.* (2006) en sus análisis de secuencias completas correspondientes al gen 18S RNAr de *Anopheles atroparvus* van Thiel y *Anopheles plumbeus* Stephens de España, determinaron que las secuencias cortas eran más ricas en los nucleótidos A y T que las secuencias largas, que fueron más ricas en nucleótidos G y C. Además las secuencias largas poseían varias regiones conservadas, que permitieron el alineamiento de secuencias de anofelinos pertenecientes a especies evolutivamente dis-

tantes. Sobre la base de estos resultados los autores propusieron trabajar siempre con secuencias completas para análisis filogenéticos de especies de anofelinos en base a secuencias del gen 18S RNAr.

28S RNAr

El gen 28S RNAr codifica al RNA estructural de la subunidad mayor de los ribosomas citoplasmáticos eucariotas 60S, y por lo tanto, es uno de los componentes básicos de todas las células eucariotas (Chan *et al.*, 1983). Si bien las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes 28S RNAr que están disponibles en las bases públicas de datos son en general de menor tamaño (menores de 500 pb) con respecto a las secuencias obtenidas a partir del gen 18S RNAr (Caterino *et al.*, 2000), se han documentado algunos trabajos donde el análisis de secuencias 28S DNAr, fueron eficientes para diferenciar especies de *Anopheles* que comprenden grupos de especies. Sharpe *et al.* (1999) reportaron dos métodos basados en la amplificación de una región variable del gen 28S RNAr, para diferenciar cuatro especies de *Anopheles* que comprenden el grupo de *Anopheles minimus* Theobald y que son morfológicamente similares (*An. aconitus* Dönitz, *An. varuna* Iyengar y *An. minimus* especies A y C). Una de las técnicas utilizadas por los autores denominada PCR alelo-específica (*Allele-Specific Amplification* o ASA), técnica ampliamente utilizada para diagnosis de especies, solo permitió diferenciar *An. minimus* A de *An. minimus* C. La segunda técnica denominada polimorfismo de conformación de cadena simple (*Single-Strand Conformation Polymorphisms* o SSCPs) les permitió diferenciar las cuatro especies. Sobre la base de estos resultados los autores concluyeron que la técnica SSCP, basada en la amplificación de secuencias 28S DNAr, tiene un gran potencial para suministrar información genética de poblaciones de mosquitos. Resultados similares fueron obtenidos cuando se intentó distinguir dos especies que comprenden el complejo de *Anopheles maculatus* Theobald (*An. dispar* Rattanarithikul y Harbach y *An. greeni* Rattanarithikul y Harbach) que pueden ser diferenciadas por análisis morfológico y de sus cromosomas. Los análisis basados en la similitud de secuencias correspondientes al gen 28S RNAr permitieron encontrar evidencias de variación interespecífica, lo que permitió diferenciar a las dos especies analizadas. La poca variabilidad intraespecífica detectada en el análisis de estos autores, incrementa el valor de este marcador molecular para fines de diagnóstico de estas especies (Torres *et al.*, 2000).

Finalmente, otro ejemplo de la eficiencia del gen 28S RNAr para diferenciar especies de mosqui-

tos puede hallarse en el trabajo de Singh *et al.* (2004). Estos autores analizaron diferencias en secuencias del dominio D3 de este gen, con la finalidad de poder distinguir tres especies crípticas comprendidas en el complejo de *Anopheles fluviatilis* James, que hasta el momento solo podía lograrse mediante estudios citotaxonómicos. Los resultados obtenidos por estos investigadores fueron cotejados con individuos de diferentes poblaciones simpátricas e identificados a través del examen de sus cromosomas politénicos. El análisis de las secuencias correspondientes al dominio D3 permitió diferenciar inequívocamente todos los miembros del complejo.

Región ITS (ITS1, 5.8S RNAr e ITS2)

Los espaciadores transcritos internos (*Internal Transcribed Spacer* o ITS) son fragmentos de DNA que se encuentran situados entre las secuencias que codifican a las subunidades ribosomales pequeña y grande en los cromosomas. En eucariotas existen dos sitios ITS, uno de ellos, el ITS1, está localizado entre los genes ribosomales 18S y 5.8S RNAr, el otro, el ITS2, se encuentra entre el gen ribosomal 5.8S y el 28S RNAr (Lafontaine y Tollervey, 2001). Al conjunto ITS1, 5.8S RNAr y ITS2 se lo denomina región ITS. Actualmente está en discusión cuál de estas regiones sería más útil para la identificación molecular de especies. Recientemente Wang *et al.* (2015) abordaron esta temática considerando tres aspectos principales: primero, la eficiencia de amplificación de cada fragmento por la técnica de PCR; segundo, la discriminación de especies y la secuenciación de DNA en términos de la presencia de espacios (*gaps*) en el código del DNA, la eficacia de discriminación de especies, la distribución del tamaño de las secuencias obtenidas y el contenido de GC; y tercero, la universalidad de los cebadores para estos genes. Luego de analizar un total de 85.345 secuencias que incluían algunas pertenecientes a insectos, determinaron que para identificar especies eucariotas la región ITS1 es más útil que la región ITS2.

Para identificar especies de mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* se han utilizado secuencias de estas regiones. En particular, para el género *Aedes*, Wesson *et al.* (1992) analizaron secuencias y estructuras secundarias correspondientes a las regiones ITS1 e ITS2 de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e ITS2 de otras seis especies: *Stegomyia* (*Mukwaya*) *simpson* Theobald, *Ae. albopictus*, *Ae. vexans*, *Ochlerotatus* (*Protomacleaya*) *triseriatus* (Say), *Haemagogus mesodentatus* Komp y Kumm y *Psorophora ferox*. Sus resultados permitieron demostrar algunas diferencias intraespecíficas cuando

analizaron secuencias correspondientes a la misma especie. Las siete especies estudiadas pudieron diferenciarse correctamente entre sí mediante estos análisis. Estudios similares se llevaron a cabo para diferenciar *An. dispar* Rattanarithikul y Harbach y *An. greeni* Rattanarithikul y Harbach, dos especies del complejo *An. maculatus* Theobald. Torres *et al.* (2000) analizaron los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (técnica conocida como *Restriction Fragment Length Polymorphism* o RFLP) generados por la enzima de restricción *HaeIII* sobre el producto de amplificación del fragmento correspondiente a la región ITS2. Estos análisis permitieron diferenciar patrones de bandas específicos para cada una de las dos especies estudiadas. Al mismo tiempo, el análisis de las secuencias ITS2 obtenidas de las dos especies difirieron en un 4 % entre sí. Ambos resultados posibilitaron distinguir a las dos especies. La misma técnica fue utilizada en otros trabajos para diferenciar especies isomórficas del género *Anopheles* (Cockburn *et al.*, 1993; Beebe y Saul, 1995; Cornel *et al.*, 1996; Foley *et al.*, 1996) y especies del género *Culex* (Crabtree *et al.*, 1995).

Analizando secuencias correspondientes a la región ITS2, Linton *et al.* (2002) diferenciaron especies del complejo *Anopheles maculipennis* Meigen de Florina, Grecia. El análisis de las secuencias reveló la existencia de dos especies dentro de este complejo: *An. maculipennis* y *An. messeae* Falleroni. Wilkerson *et al.* (2004) estudiaron el complejo *Anopheles crucians* Wiedemann que está compuesto por tres especies (*An. crucians*, *An. bradleyi* King y *An. georgianus* King) de acuerdo a características morfológicas. Obtuvieron muestras de Alabama, Florida, Georgia, Carolina del Norte, Mississippi, y Louisiana. Posteriormente analizaron los individuos por medio de caracteres morfológicos y técnicas moleculares. El análisis de las secuencias obtenidas permitió determinar que este complejo, en las localidades mencionadas, está constituido por seis especies, mientras que por medio de la identificación morfológica solo se logra distinguir a *An. bradleyi*.

Respecto a estudios de secuencias ITS de mosquitos de distribución en la región Neotropical, podemos citar el trabajo llevado a cabo por Li y Wilkerson (2007). Estos autores analizaron secuencias ITS2 de cuatro especies pertenecientes al complejo *Anopheles albitarsis*. A pesar de la poca divergencia (1,17 %) encontrada entre las secuencias, los autores confirman que la variación intragenómica es adecuada para la diferenciación de las especies del complejo. Las variaciones detectadas provinieron de dos regiones microsátélites y el número de indeles y sustituciones de bases de las secuencias analizadas. Por otro lado, analizaron las secuencias obteni-

das a partir de machos y hembras de estas especies y determinaron que no hay diferencias entre sexos, lo que sugiere que existen arreglos similares en el DNA en los cromosomas X e Y. En América del Sur fueron reportados algunos trabajos donde fueron analizadas secuencias ITS de mosquitos, con la finalidad de confirmar algunos dilemas taxonómicos. Conn *et al.* (2013) lograron diferenciar por medio de secuencias ITS2 dos anofelinos, la especie B de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *benarrochi* Gabaldon, Cova-García y López y *Anopheles rangeli* de Perú. Recientemente, Gómez *et al.* (2015) estudiaron siete morfoespecies de *Anopheles* de la serie Arribalzagia de Colombia, analizando secuencias del ITS2 y secuencias COI. El análisis en conjunto de los resultados obtenidos de las dos secuencias (una alta variación intraespecífica de las secuencias COI y diferencias fijas en las secuencias ITS) permitió agrupar en diferentes clados a las morfoespecies *Anopheles punctimacula*, *Anopheles calderoni* Wilkerson, *Anopheles malefactor* Dyar y Knab, *Anopheles neomaculipalpus*, *Anopheles apicimacula*, *Anopheles mattogrossensis* Lutz y Neiva y *Anopheles peryassui* Dyar y Knab, confirmando que *An. apicimacula* es un complejo.

Locus de la Acetylcholinesterasa-2 (*ace-2*)

La presencia de dos genes nucleares que codifican la acetilcolinesterasa (*ace*) fue descubierta en *Cx. pipiens* y posteriormente confirmada en otras especies de mosquitos (Bourguet *et al.*, 1996; Malcolm *et al.*, 1998; Weill *et al.*, 2002). El gen *ace-1* puede conferir resistencia a insecticidas organofosforados y por lo tanto está sujeto a la presión de selección. El gen *ace-2* está ligado al sexo y no se conoce su función exacta, ni tampoco si la presión de selección actúa sobre este gen. Smith y Fonseca (2004) analizaron polimorfismos en el segundo intron del gen *ace-2* para diferenciar especies del género *Culex*. La técnica utilizada por los autores fue una reacción de PCR por espécimen, la cual generó bandas únicas para cada especie que pueden ser observadas fácilmente en un gel de agarosa. Los resultados permitieron diferenciar especies cercanas de *Culex* (*Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens pallens*, *Cx. australicus* Dobrotworsky y Drummond), otras dos especies que comúnmente son clasificadas como *Cx. pipiens* (*Cx. torrentium* Martini y *Cx. pervigilans* von Bergroth) e híbridos de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus*. A pesar de la efectividad obtenida con este método por estos autores, el mismo no les permitió diferenciar las dos formas de *Cx. pipiens*: *pipiens* y *molestus*. Esta dos formas solo habrían podido ser diferenciadas molecularmente mediante análisis de microsatélites (Smith *et al.*,

2005). Debido a que el protocolo para obtener microsatélites es laborioso y consume mucho tiempo, Bahnck y Fonseca (2006) publicaron un método para diferenciar las formas de *Cx. pipiens*, usando una conjunción del ensayo aplicado por Smith y Fonseca (2004) y la observación de la variación de las regiones flanqueantes de uno de los locus (CQ11) de los microsatélites de esta especie. Este ensayo rápido, económico y confiable, permitió diferenciar correctamente las formas *pipiens* y *molestus*. Sanogo *et al.* (2008) por medio de la técnica de PCR en tiempo real, usando cebadores y sondas fluorogénicas específicas para cada especie, diseñados en base a las secuencias del gen *ace-2*, pudieron identificar a *Culex pipiens pipiens*, *Cx. p. quinquefasciatus*, *Cx. restuans* Theobald, *Cx. salinarius* Coquillett, *Cx. nigripalpus* Theobald y *Cx. tarsalis* Coquillett.

Microsatélites

Los microsatélites son secuencias de DNA constituidas por repeticiones consecutivas de 1 a 6 nucleótidos (Hancock, 1999). Estos pequeños fragmentos se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes, y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud. Por este motivo son regiones adecuadas para ser usadas como marcadores moleculares a nivel poblacional (Zane *et al.*, 2002). A partir de poblaciones de *Cx. pipiens*, fueron descritos diferentes loci de microsatélites para poder diferenciar especies que se encuentran dentro de este complejo y que son difíciles de determinar de acuerdo con sus caracteres morfológicos (Fonseca *et al.*, 1998; Keyghobadi *et al.*, 2004). Fonseca *et al.* (2004), utilizaron ocho loci de microsatélites (CQ11, CQ26, CxqGT4, CxqGT6b, CxpGT4, CxpGT9, CxpGT12, y CxpGT46), para analizar miembros del complejo *Cx. pipiens* con el fin de discriminar formas autógenas (en poblaciones subterráneas) y formas anautógenas (en poblaciones no subterráneas) de *Cx. pipiens* de Gran Bretaña y Alemania. También analizaron otras poblaciones anautógenas de Suecia, Francia, Italia, norte de África, Oriente Medio, Japón, Australia y Estados Unidos. Mediante el análisis de estos microsatélites en muestras de Europa, cada forma, que difiere en su comportamiento y fisiología, generó un perfil único de microsatélites (*fingerprint*), que permitió diferenciarlas perfectamente entre sí. Keyghobadi *et al.* (2004) utilizaron grupos de microsatélites en poblaciones de *Cx. pipiens* de Albany, Estados Unidos y concluyeron que estos marcadores son útiles para estudios de estructura de la población y de la variación intraespecífica de esta especie, permitiendo detectar híbridos entre las dos formas. Este resultado fue de gran impor-

tancia para comprender factores que intervienen en la circulación del virus del Nilo occidental en América del Norte. Fonseca *et al.* (2009) realizaron estudios con microsatélites en *Cx. pipiens pallens*, mosquito perteneciente al complejo *Cx. pipiens* de Asia de estatus taxonómico controversial. El análisis de las secuencias suministró una fuerte evidencia de que *Cx. pipiens pallens* constituye una subespecie con identidad propia, diferente de la subespecie *Cx. pipiens pipiens* y de la especie *Cx. quinquefasciatus* de Europa. Los análisis del genotipo de multilocus basado en los loci de microsatélites, revelaron además una reciente hibridación entre *Cx. pipiens pallens* y *Cx. quinquefasciatus* en el sur de Japón.

Amplificación aleatoria de DNA polimórfico

La amplificación aleatoria de DNA polimórfico conocida como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), es una técnica que consiste en la amplificación por medio de PCR de fragmentos de DNA, a partir de la utilización de cebadores cortos que se hibridan en regiones aleatorias del genoma. La existencia de polimorfismos entre distintos individuos se determina como la presencia o ausencia de fragmentos del DNA amplificado (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica fue muy utilizada para estudios de genética de poblaciones de especies de *Anopheles* y para diferenciar especies crípticas de este género de mosquitos (Wilkerson *et al.*, 1993; Sucharit y Komalamisra, 1997; Manguin *et al.*, 1999; Keng-

ne *et al.*, 2001; Manguin *et al.*, 2002; Posso *et al.*, 2003). También fue útil para estudios de variabilidad genética en poblaciones de *Ae. aegypti* (Arshad *et al.*, 2015), *Cx. quinquefasciatus* y *Ae. albopictus* (Gupta, 2015). Finalmente, Hoshino *et al.* (2015) diferenciaron dos líneas celulares de *Armigeres* (*Armigeres*) *subalbatus* (Coquillett), especie que se sospecha es transmisora de filariasis bancroftiana y que se usa como modelo para estudios inmunológicos, utilizando la técnica RADP-PCR.

Espaciadores intergénicos (IGS)

Estos espaciadores comprenden una de las regiones genómicas más variables y poseen un alto polimorfismo genético. Debido a estas características se consideran como marcadores prometedores para distinguir especies que no pueden ser diferenciadas por sus caracteres morfológicos. Secuencias correspondientes a la región IGS fueron utilizadas por Shaikevich *et al.* (2013) para diferenciar especies del género *Culex* (*Culex molestus*, *Culex torrentium* y *Cx. pipiens pallens*). Los resultados obtenidos por medio de los análisis de secuencias correspondientes a este gen, permitieron determinar que este marcador sería eficaz para el análisis de las relaciones filogenéticas dentro del género *Culex*, en particular, aquellos miembros pertenecientes al complejo *Cx. pipiens*.

Análisis de secuencias correspondientes a especies de mosquitos presentes en Argentina

En la actualidad, el uso de técnicas moleculares para la identificación de especies de mosquitos en Argentina es escaso. Los trabajos publicados son recientes y abordan la identificación de especies usando solo los genes 18S RNAr y COI y microsatélites.

Díaz-Nieto *et al.* (2013) analizaron la utilidad del gen 18S RNAr para identificar especies de mosquitos presentes en la ciudad de Mar del Plata y sus alrededores. En este trabajo los autores estudiaron 14 especies pertenecientes a cuatro géneros (*Culex*, *Ochlerotatus*, *Psorophora* y *Uranotaenia*) en base a ejemplares recolectados en el campo. Las secuencias obtenidas a partir de las especies identificadas, fueron comparadas con secuencias de las bases públicas de datos, pertenecientes a especies de estos géneros. Adicionalmente se utilizaron secuencias correspondientes a los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Toxorhynchites* para realizar los análisis filogenéticos. Las estimaciones filogenéticas, obteni-

das a partir de secuencias de ese gen, permitieron establecer clados a nivel supragenérico, genérico y específico. A nivel supragenérico, los resultados consignados en Díaz-Nieto *et al.* (2013) mostraron que las especies se agruparon en las subfamilias Anophelinae y Culicinae en coincidencia con la clasificación tradicional. A nivel de género, los clados construidos con la técnica molecular empleada agruparon especies también concordantemente con la taxonomía basada en la morfología. Así, las especies de *Anopheles* formaron un grupo basal con respecto a los otros miembros de la familia; *Toxorhynchites* integró un clado basal con Culicinae, sosteniendo a *Toxorhynchitini* como una tribu separada pero no como una subfamilia; se confirmó la monofilia de *Culex*; la idea de sostener a *Ochlerotatus* como un género separado de *Aedes* no fue compatible con los árboles filogenéticos; *Psorophora* integró un clado diferente de *Ochlerotatus* y *Aedes*; *Aedeomyia* y *Uranotaenia* resultaron más estrechamente relaciona-

dos con el Grupo *Ochlerotatus* + *Aedes* que con *Psorophora*, *Culiseta* y el grupo *Coquillettidia*. Finalmente, a nivel específico, se observaron agrupaciones que no estaban en completa correspondencia con la clasificación tradicional. Por ejemplo, las dos especies de *Ochlerotatus* recolectadas en la zona de estudio (*Oc. crinifer* y *Oc. albifasciatus*) no pudieron ser separadas como especies diferentes en las filogenias generadas; *Psorophora cyanescens*, único representante nativo del género en las muestras, no pudo ser diferenciada de especies congénicas foráneas incluidas en este análisis; similarmente, *Uranotenia lowi* (especie nativa) no pudo separarse de *Uranotaenia sapphirina* (Osten Sacken) (especie exótica). Con respecto al género *Culex*, se obtuvo resolución suficiente para separar algunas especies, como en el caso de *Culex maxi*, *Cx. brethesi* y *Cx. eduardoi*, pero no para otras como *Cx. pipiens*, que no se pudo separar de *Cx. apicinus*, o *Cx. renatoi* de *Cx. chidesteri*. En resumen, el estudio sugirió que no habría información suficiente en estos genes para lograr la separación específica sin ambigüedades.

De acuerdo a estos resultados, Díaz-Nieto et al. (2013) concluyeron que el análisis de secuencias 18S DNAr correspondientes a especies de culícidos de Argentina resultó ser una herramienta eficiente para diferenciar mosquitos a nivel genérico, y que el método posee limitaciones para diferenciar culícidos a nivel específico. Finalmente, destacaron que estas incongruencias encontradas en el análisis de las secuencias correspondientes al gen 18S RNAr, también se encuentran actualmente en discusión entre los investigadores que realizan estudios taxonómicos en base a caracteres morfológicos, enfatizando principalmente las dificultades durante la identificación de algunas especies del género *Culex* (Duret, 1953; Bram, 1967; Sirivanakarn y White, 1978; Mitchell et al., 1984; Brewer et al., 1987; Ishii, 1991; Almirón et al., 1995; Vinogradova, 2000; Harbach, 2007; 2013; Huang et al., 2011; Micieli et al., 2013).

Por otro lado, Laurito et al. (2013) estudiaron 22 especies del subgénero *Culex* (*Culex*) procedentes de Argentina y Brasil, y encontraron que del total de secuencias COI obtenidas a partir de insectos adultos, el 69 % fue adjudicado correctamente a la

especie determinada de acuerdo con criterios morfológicos, a través del algoritmo de coincidencia más cercana (*Best Close Match*). Los CBG de *Cx. pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* se solaparon en el análisis *neighbor-joining* (NJ), hecho que los autores relacionaron con la existencia de formas intermedias o híbridos en la provincia de Córdoba (Brewer et al., 1987) y la reciente especiación del complejo *Cx. pipiens*. Las mismas limitaciones en la aplicación de los CBG para diferenciar especies del género *Culex* que encontraron Díaz-Nieto et al. (2013) trabajando con poblaciones naturales del partido de General Pueyrredón (Buenos Aires) fueron encontradas por Laurito et al. (2013). En su análisis, las secuencias de *Culex surinamensis* Dyar, *Culex maxi*, *Culex camposi* Dyar y *Cx. coronator* se agruparon juntas en un linaje irresuelto. Sin embargo, pudieron identificar con precisión cinco linajes de mosquitos del subgénero *Culex* (*Culex*) utilizando los CBG: *Culex acharistus*, *Cx. chidesteri*, *Culex dolosus*, *Culex lygrus* Root y *Culex saltanensis*. Berrón (2014), al analizar secuencias COI de 32 especies de mosquitos distribuidos en el centro y noreste de Argentina, determinó que solo dos de ellas presentaron CBG solapados como resultado del análisis NJ de estas secuencias. Por otro lado, tres pares de especies presentaron divergencia interespecífica muy baja (*Cx. bidens* - *Culex interfor*; *Culex brethesi* - *Culex dolosus* y *Psorophora albigena* / *varipes* - *Psorophora discrucians*). En la ecorregión de las Yungas del noroeste de Argentina, fueron utilizadas recientemente secuencias del gen COI para estudiar la demografía de *Anopheles pseudo-punctipennis*. Dantur Juri et al. (2014) al analizar secuencias COI de mosquitos obtenidos de esa área, no encontraron diferencias entre poblaciones del norte y del sur de las yungas, por lo cual propusieron que existe un flujo génico entre esas zonas de esa ecorregión.

Micieli et al. (2013) analizaron microsatélites, previamente utilizados para estudiar especies del género *Culex* (Smith et al., 2005), en ejemplares de ese género recolectados en zanjas de drenaje de las ciudades de La Plata y Berisso. El análisis de las secuencias obtenidas permitieron revelar la presencia de *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. pipiens* forma *moles-tus* e híbridos en las poblaciones de mosquitos estudiados.

Conclusiones

Existe un número importante de especies de culícidos que carecen de caracteres morfológicos inequívocos para su determinación taxonómica en algunos de sus estados y/o sexo. Los métodos moleculares de identificación taxonómica han probado

ser exitosos en muchos de estos casos. Los continuos resultados positivos en este sentido han promovido que cada vez más grupos de investigación utilicen estas técnicas para la determinación confiable de especies de mosquitos isomórficas o de difícil

determinación morfológica. Simultáneamente, muchos de estos grupos han contribuido y contribuyen a incrementar el número de secuencias patrón disponible en las bases de secuencias génicas públicas, de manera de ampliar el número de especies de culícidos representadas y la cobertura geográfica de dichas especies. En consecuencia, a medida que aumenta el número de secuencias patrón disponible, la técnica se torna cada vez más eficaz.

Para que la herramienta funcione correctamente es necesario que las bases públicas de secuencias génicas sean confiables; es decir, las secuencias patrones deben provenir de ejemplares correctamente identificados taxonómicamente. Idealmente, los especímenes que den origen a secuencias patrones deberían estar en buen estado de conservación, permanecer en colecciones públicas y deberían ser identificados por taxónomos experimentados. Linton *et al.* (2002) al analizar secuencias del gen ITS2 de especies pertenecientes al complejo de *Anopheles maculipennis*, determinaron que existían errores y discrepancias cuando analizaban secuencias similares de las mismas especies. Debido a esto plantearon que, en muchos casos, las bases de datos públicas, al no considerar de qué manera se realiza la identificación de las especies a partir de las cuales se generan las secuencias, pueden incluir datos de muestras que han sido identificadas incorrectamente, secuencias de calidad dudosa, especímenes de origen desconocido o una combinación de dichos errores y en estos casos, dichas bases actúan como un repositorio no curado para los datos de las secuencias. Por estos motivos, en el momento en que se toma información de estas bases de datos, cada investigador debe establecer los recaudos necesarios para elegir las secuencias que incluirá en sus análisis. Probablemente en un futuro las bases públicas de datos tomen en cuenta los mecanismos considerados en la identificación previa de los ejemplares a partir de los cuales se genera cada una de las secuencias. En este sentido, el *Barcode of Life Data Systems* (BOLDSystems: www.boldsystems.org), que es un repositorio de datos de secuencias del gen COI y de los especímenes que las originan (además de una plataforma de trabajo para los investigadores que desean trabajar con los CBG), exige ciertas condiciones para que las secuencias adquieran el status de “código de barras”: que sean secuencias de alta calidad y que las mismas puedan ser asociadas a un espécimen cuya taxonomía pueda ser revisada continuamente a través de su depósito en colecciones públicas y permanentes (Ratnasingham y Hebert, 2007). Además, entre otros datos, se requiere el nombre, la institución y el correo electrónico de la persona que identifica a los ejemplares a partir

de los cuales se originan los CBG, la cual puede ser consultada ante cualquier duda.

Por otro lado, se debe discutir también la factibilidad de realizar la identificación de las especies por métodos basados en caracteres morfológicos o por métodos de biología molecular. En términos generales, para realizar la identificación morfológica solo se requiere de un equipo óptico adecuado, una o varias claves taxonómicas y un investigador entrenado. Solo en algunos casos es necesario realizar el montaje de genitalias, que implica el uso de algunos insumos de bajo costo, pero requiere tiempo y experiencia por parte de quien lo lleve a cabo. Para la identificación taxonómica a partir de secuencias génicas, en cambio, se necesitan reactivos e insumos costosos, algunos equipamientos tales como microcentrífuga, termociclador, cubas de electroforesis y digitalizador de imágenes, así como un servicio de secuenciación. Sin duda, las técnicas de biología molecular tienen un costo mayor, no obstante los mismos han disminuido considerablemente en los últimos años debido al intenso uso que los grupos de investigación hacen de ellas. En general, se puede decir que estas técnicas hoy son de fácil acceso para gran parte de los equipos científicos del país. Es claro que ambas metodologías tienen ventajas y desventajas, por lo que la decisión de cuál será la mejor opción para identificar a las especies dependerá de cada caso. En los casos en los que los especímenes sean de fácil e inequívoca identificación a través de su anatomía externa, la mejor opción posiblemente sea la determinación taxonómica basada en los caracteres morfológicos, ya que se podrá realizar rápidamente, con bajo esfuerzo humano y bajo costo económico. Por otro lado, para identificar especies isomórficas u organismos en mal estado de conservación, las herramientas moleculares serán la mejor opción. Sin embargo, aun en la actualidad hay algunas inconsistencias entre la identificación a través de caracteres morfológicos y la taxonomía molecular y hasta el momento no hay consenso con respecto a qué criterio se debería tomar en estos casos. Por lo tanto cada investigador deberá decidir qué herramienta será más correcta de acuerdo a la problemática a resolver.

Las técnicas de identificación de las especies basadas en los caracteres morfológicos son eficientes en muchos casos; cuando no, las herramientas moleculares son de gran ayuda. Es indiscutible el aporte que las mismas han realizado en la identificación, por ejemplo, de ejemplares en mal estado de conservación, especímenes en estadios de desarrollo temprano para los cuales no hay claves disponibles, especies crípticas y complejos de especies. Sin embargo, a veces ninguna de las técnicas menciona-

das resuelve la identificación taxonómica. Son los casos de posible especiación reciente, hibridación, etc. Por ello consideramos, al igual que muchos otros investigadores, que la taxonomía de hoy en día debe-

ría abordarse desde un enfoque multidisciplinario, que incluya datos morfológicos, moleculares, ecológicos y de distribución geográfica.

Bibliografía

- Almirón WR, Humeres SG, Gardenal CN. 1995. Distribution and hybridization between *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. 90: 469-473.
- Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y, Ready PD. 2000. Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. Insect Mol Biol. 9: 157-168.
- Arshad Z, Akram W, Zahoor MK, Qureshi NA, Nasir S. 2015. Genetic variability in dengue mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Punjab, Pakistan using RAPD markers. Pak J Agri Sci. 52: 1065-1071.
- Bahnck CM, Fonseca DM. 2006. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex (Culex) pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. Am J Trop Med Hyg. 75: 251-255.
- Bargues MD, Latorre JM, Morchon R, Simon F, Escosa R, Aranda C, Sainz S, Fuentes MV, Mas-Coma S. 2006. rDNA sequences of *Anopheles* species from the Iberian peninsula and an evaluation of the 18S rRNA gene as phylogenetic marker in anophelinae. J Med Entomol. 43: 508-517.
- Becker N, Petric D, Zgomba M, Boase C, Madon M, Dahl C, Kaiser A. 2010. Mosquitoes and their control. 1^o ed. Springer.
- Beckingham K. 1982. Insect rDNA. En: Busch H, Rothblum L, eds. New York: Academic Press. pp. 205-269.
- Beebe NW, Cooper RD, Morrison DA, Ellis JT. 2000a. A phylogenetic study of the *Anopheles punctulatus* group of malaria vectors comparing rDNA sequence alignments derived from the mitochondrial and nuclear small ribosomal subunits. Mol Phylogenet Evol. 17: 430-436.
- Beebe NW, Cooper RD, Morrison DA, Ellis JT. 2000b. Subset partitioning of the ribosomal DNA small subunit and its effects on the phylogeny of the *Anopheles punctulatus* group. Insect Mol Biol. 9: 515-520.
- Beebe NW, Saul A. 1995. Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. American Am J Trop Med Hyg. 53: 478-481.
- Berrón CI. 2014. Preferencia de hospedadores aviares en especies de mosquitos Género *Culex* asociadas a la transmisión de Flavivirus (Flaviviridae) en el arco sur de la laguna Mar Chiquita. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Córdoba.
- Bourguet D, Raymond M, Fournier D, Malcolm CA, Toutant JP, Arpagaus M. 1996. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). J Neurochem. 67: 2115-2123.
- Bram RA. 1967. Classification of *Culex* subgenus *Culex* in the new world (Diptera: Culicidae). Proceedings of the United States National Museum. 120: 1-122.
- Brewer M, Buffa L, Almirón W. 1987. *Culex pipiens quinquefasciatus* y *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae) en Córdoba, Argentina. Rev Per Entomol. 29: 69-72.
- Caterino MS, Cho S, Sperling FA. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annu Rev Entomol. 45: 1-54.
- Chan A, Chiang LP, Hapuarachchi HC, Tan CH, Pang SC, Lee R, Lee KS, Ng LC, Lam-Phua SG. 2014. DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. Parasit Vectors 7: 569.
- Chan YL, Olivera J, Wool IG. 1983. The structure of rat 28S ribosomal ribonucleic acid inferred from the sequence of nucleotides in a gene. Nucleic Acids Res. 11: 7819-7831.
- Cockburn AF, Zhang Z, Perera OP, Kaiser P, Seawright JA, Mitchell SE. 1993. A new species of the *Anopheles crucians* complex: detection by mitochondrial DNA polymorphisms. Proceedings of the Third Symposium, 8-11 February 1993, Vero Beach, FL.
- Coetzee M, Hunt RH, Wilkerson R, Della Torre M, Mamadou B, Coulibaly MB, Besansky NJ. 2013. *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. Zootaxa. 3619: 246-274.
- Conn JE, Moreno M, Saavedra M, Bickersmith SA, Knoll E, Fernandez R, Vera H, Burrus RG, Lescano AG, Sanchez JF, Rivera E, Vinetz JM. 2013. Molecular taxonomy of *Anopheles (Nyssorhynchus) benarrochi* (Diptera: Culicidae) and malaria epidemiology in southern Amazonian Peru. Am J Trop Med Hyg. 88: 319-324.
- Cornel AJ, Porter CH, Collins FH. 1996. Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences. J Med Entomol. 33: 109-116.
- Crabtree MB, Savage HM, Miller BR. 1995. Development of a species-diagnostic polymerase chain reaction assay for the identification of *Culex* vectors of St. Louis encephalitis virus based on interspecies sequence variation in ribosomal DNA spacers. Am J Trop Med Hyg. 53: 105-109.
- Cywinska A, Hunter FF, Hebert PDN. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. Med Vet Entomol. 20: 413-424.
- Dantur Juri MJ, Moreno M, Izaguirre MJP, Navarro JC, Zaidenberg MO, Almirón WR, Claps GL, Conn JE. 2014. Demographic history and population structure of *Anopheles pseudopunctipennis* in Argentina based on the mitochondrial COI gene. Parasit Vectors. 7: 423.
- Demari-Silva B, Tavares Vesgueiro F, Sallum MA, Toledo Marrelli M. 2011. Taxonomic and Phylogenetic Relationships between Species of the Genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil Inferred from the Cytochrome c Oxidase I Mitochondrial Gene. J Med Entomol. 48: 272-279.
- Díaz-Nieto LM, Maciá A, Parisi G, Farina JL, Vidal-Domínguez ME, Perotti MA, Berón CM. 2013. Distribution of mosquitoes in the south east of Argentina and first report on the analysis based on 18S rDNA and COI sequences. Plos One. 8: e75516.
- Duret JP. 1953. Notas sobre *Culex* Argentinos (Diptera: Culicidae). Rev San Milit Argen. 52: 272-278.
- Foley DH, Beebe NW, Torres EP, Saul A. 1996. Misidentification of a Philippine malaria vector revealed by allozyme and ribosomal DNA markers. Am J Trop Med Hyg. 54: 46-48.
- Fonseca DM, Atkinson CT, Fleischer RC. 1998. Microsatellite primers for *Culex pipiens quinquefasciatus*, the vector of avian malaria in Hawaii. Mol Ecol. 7: 1617-1619.
- Fonseca DM, Keyghobadi N, Malcolm CA, Mehmet C, Schaffner F, Mogi M, Fleischer RC, Wilkerson RC. 2004. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. Science. 303: 1535-1538.
- Fonseca DM, Smith JL, Kim HC, Mogi M. 2009. Population genetics of the mosquito *Culex pipiens pallens* reveals sex-linked asymmetric introgression by *Culex quinquefasciatus*. Infect Genet Evol. 9: 1197-1203.
- Gao Q, Beebe NW, Cooper RD. 2004. Molecular identification of the malaria vectors *Anopheles anthropophagus* and *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) in central China using polymerase chain reaction and appraisal of their position within the *Hyrceanus* group. J Med Entomol. 41: 5-11.
- Gillespie JJ, Johnston JS, Cannone JJ, Gutell RR. 2006. Characteristics of the nuclear (18S, 5.8 S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. Insect Mol Biol. 15: 657-686.
- Gómez GF, Bickersmith SA, González R, Conn JE, Correa MM. 2015. Molecular taxonomy provides new insights into *Anopheles* species of the

- neotropical Arribalzagia series. Plos One. 10: e0119488.
35. González R, Carrejo N, Wilkerson RC, Alarcon J, Alarcon-Ormasa J, Ruiz F, Bhatia R, Loaiza J, Linton Y. 2010. Confirmation of *Anopheles (Anopheles) calderoni* Wilkerson, 1991 (Diptera: Culicidae) in Colombia and Ecuador through molecular and morphological correlation with topotypic material. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105: 1001-1009.
36. Gunay F, Alten B, Simsek F, Aldemir A, Linton Y. 2015. Barcoding Turkish *Culex* mosquitoes to facilitate arbovirus vector incrimination studies reveals hidden diversity and new potential vectors. Acta Tropica. 143: 112-120.
37. Gupta S. 2015. Genetic analysis of selected mosquito vectors using random amplified polymorphic DNA RAPD Marker in Agra region. PhD thesis. Faculty of Science Dayalbagh Educational Institute. Deemed University. Dayalbagh.
38. Hancock JM. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein DB, Schlötterer C eds. Microsatellites, evolution and applications. Oxford University Press. Oxford, Nueva York. pp. 1-10.
39. Harbach RE. 2007. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. Zootaxa. 638: 591-638.
40. Harbach RE. 2012. *Culex pipiens*: species versus species complex - taxonomic history and perspective. J Am Mosq Control Assoc. 28: 10-23.
41. Harbach RE. 2013. *Culex* classification. Mosquito taxonomic inventory. Disponible en: <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>. Accessed: 24 April 2013.
42. Harrison BA, Ruiz-Lopez F, Calderon Falero G, Savage HM, Pecor JE, Wilkerson RC. 2012. *Anopheles (Kerteszia) lepidotus* (Diptera: Culicidae), not the malaria vector we thought it was: Revised male and female morphology; larva, pupa and male genitalia characters; and molecular verification. Zootaxa. 3218: 1-17.
43. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci. 270: 313-321.
44. Hillis DM, Dixon MT. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol. 411-453.
45. Hoshino K, Isawa H, Kuwata R, Tajima S, Takasaki T, Iwabuchi K, Sawabe K, Kobayashi M, Sasaki T. 2015. Establishment and characterization of two new cell lines from the mosquito *Armigeres subalbatus* (Coquillett) (Diptera: Culicidae). In Vitro Cell Devel Biol. 51: 672-679.
46. Huang S, Molaei G, Dreads TG. 2011. Reexamination of the *Culex pipiens* hybridization zone in the eastern United States by ribosomal DNA-based single nucleotide polymorphism markers. Am J Trop Med Hyg. 85: 434-441.
47. Huelisenbeck JP, Ronquist F. 2000. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogeny. NY: Department of Biology, University of Rochester, Rochester Press.
48. Ishii T. 1991. The *Culex pipiens* complex. An old but new insect pest. SP World, Osaka. 18: 12-15.
49. Jaramillo LM, Gutiérrez LA, Luckhart S, Conn JE, Correa MM. 2011. Molecular evidence for a single taxon, *Anopheles nuneztovari* sl, from two endemic malaria regions in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106: 1017-1023.
50. Kengne P, Trung HD, Baimai V, Coosemans M, Manguin S. 2001. A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. Insect Mol Biol. 10: 427-435.
51. Kerr KCR, Lijtmaer DA, Barreira AS, Herbert PDN, Tubaro PL. 2009. Probing evolutionary patterns in Neotropical birds through DNA barcodes. Plos One. 4: e4379.
52. Kerr KCR, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. Mol Ecol Notes. 7: 535-543.
53. Keyghobadi N, Matrone MA, Ebel GD, Kramer LD, Fonseca DM. 2004. Microsatellite loci from the northern house mosquito (*Culex pipiens*), a principal vector of West Nile virus in North America. Mol Ecol. 4: 20-22.
54. Koekemoer LL, Kamau Hunt RH, Coetzee M. 2002. A cocktail polymerase chain reaction assay to identify members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group. Am J Trop Med Hyg. 6: 804-811.
55. Kumar NP, Rajavel AR, Natarajan R, Jambulingam P. 2007. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol. 44: 1-7.
56. Lafontaine DL, Tollervey D. 2001. The function and synthesis of ribosomes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2: 514-520.
57. Laurito M, Oliveira TM, Almirón WR, Sallum MA. 2013. COI barcode versus morphological identification of *Culex (Culex)* (Diptera: Culicidae) species: a case study using samples from Argentina and Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 108: 110-122.
58. Li C, Wilkerson RC. 2007. Intragenomic rDNA ITS2 variation in the neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albipennis* complex (Diptera: Culicidae). J Hered. 98: 51-59.
59. Linton YM, Pecor JE, Porter CH, Mitchell LB, Garzón-Moreno A, Foley DH, Pecor DB, Wilkerson RC. 2013. Mosquitoes of eastern Amazonian Ecuador: biodiversity, bionomics and barcodes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 108: 100-109.
60. Linton YM, Samanidou-Voyadjoglou A, Harbach RE. 2002. Ribosomal ITS2 sequence data for *Anopheles maculipennis* and *An. messeae* in northern Greece, with a critical assessment of previously published sequences. Insect Mol Biol. 11: 379-383.
61. Maddison D, Baker MD, Ober K. 1999. Phylogeny of carabid beetles as inferred from 18S ribosomal DNA (Coleoptera: Carabidae). Syst Entomol. 24: 103-138.
62. Malcolm CA, Bourguet D, Ascolillo A, Rooker SJ, Garvey CF, Hall LM, Pasteur N, Raymond M. 1998. A sex-linked Ace gene, not linked to insensitive acetylcholinesterase-mediated insecticide resistance in *Culex pipiens*. Insect Mol Biol. 7: 107-120.
63. Manguin S, Kengne P, Sonnier L, Harbach RE, Baimai V, Trung HD, Coosemans M. 2002. SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. Med Vet Entomol. 16: 46-54.
64. Manguin S, Wilkerson RC, Conn JE, Rubio-Palis Y, Danoff-Burg JA, Roberts DR. 1999. Population structure of the primary malaria vector in South America, *Anopheles darlingi*, using isozyme, random amplified polymorphic DNA, internal transcribed spacer 2, and morphologic markers. Am J Trop Med Hyg. 60: 364-76.
65. Micieli MV, Matarachero AC, Muttis E, Fonseca DM, Aliota MT, Kramer LD. 2013. Vector competence of Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae) for West Nile virus (Flaviviridae: Flavivirus). Med Entomol. 50: 853-862.
66. Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. 1997. Phylogenetic relationships of the Culicomorpha inferred from 18S and 5.8S ribosomal DNA sequences (Diptera: Nematocera). Insect Mol Biol. 6: 105-114.
67. Mitchell C, Darsie R, Monath T. 1984. Occurrence of autogenous *Culex pipiens* Linnaeus 1758 (Diptera: Culicidae) in Argentina and notes on distribution of the complex. Mosq Sys. 16: 308-316.
68. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in-vitro*: the polymerase chain reaction. En: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 263-273.
69. Munstermann LE. 1995. Mosquito systematics: current status, new trends, associated complications. J Vector Ecol. 20: 129-138.
70. Munstermann LE, Conn JE. 1997. Systematics of mosquito disease vectors (Diptera: Culicidae): Impact of molecular biology and cladistic analysis. Annu Rev Entomol. 42: 351-369.
71. Noller HF. 2005. RNA structure: reading the ribosome. Science. 309: 1508-1514.
72. Phuc HK, Ball AJ, Son L, Hanh NV, Tu ND, Lien NG, Verardi A, Townson H. 2003. Multiplex PCR assay for malaria vector *Anopheles minimus* and four related species in the Myzomyia Series from Southeast Asia. Med Vet Entomol. 17: 423-428.
73. Polanco C, González AI, de la Fuente A, Dover GA. 1998. Multigene family of ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* reveals contrasting patterns of homogenization for IGS and ITS spacer regions: a possible mechanism to resolve this paradox. Genetics. 149: 243-256.
74. Posso CE, Gonzalez R, Cardenas H, Gallego G, Duque MC, Suarez MF. 2003. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Western and northeastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 98: 469-476.
75. Rajavel AR, Kumar NP, Natarajan R, Vanamail P, Rathinakumar A, Jambulingam P. 2015. Morphological and molecular characterization of the ecological, biological and behavioural variants of the JE vector *Culex tritaeniorhynchus*: An assessment of its taxonomic status. J Vector Borne Dis. 52: 40-51.
76. Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Mol Ecol Notes. 7: 355-364.
77. Reinert JF. 2000. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. J Am Mosq Contr Assoc. 16: 175-188.
78. Ruiz F, Linton Y, Ponsonby DJ, Conn JE, Herrera M, Quiñones ML, Vélez ID, Wilkerson RC. 2010. Molecular comparison of topotypic specimens confirms *Anopheles (Nyssorhynchus) dunhami* Causey (Diptera: Culicidae) in the Colombian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105: 899-903.
79. Ruiz-Lopez F, Wilkerson RC, Conn JE, McKeon S, Levin DM, Quiñones ML, Póvoa MM, Linton Y. 2012. DNA barcoding reveals both known and novel taxa in the Albitarsis Group (*Anopheles: Nyssorhynchus*) of Neotropical malaria vectors. Parasit Vectors. 5:1.

80. Sanogo YO, Kim CH, Lampman R, Halvorsen JG, Gad AM, Novak RJ. 2008. Identification of male specimens of the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) in the hybrid zone using morphology and molecular techniques. *J Med Entomol.* 45: 203-209.
81. Schofield CJ 1988. *Biosystematics of the Triatominae*. Oxford: Clarendon Press.
82. Shaikovich EV, Zagoskin MV, Mukha DV. 2013. Comparative characteristics of the intergenic spacer of the ribosomal RNA gene cluster in mosquitoes of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae). *Mol Biol.* 47: 364-372.
83. Sharpe RG, Hims MM, Harbach RE, Butlin RK. 1999. PCR based methods for identification of species of the *Anopheles minimus* group: allele specific amplification and single strand conformation polymorphism. *Med Vet Entomol.* 13: 265-273.
84. Shepard JJ, Andreadis TG, Vossbrinck CR. 2006. Molecular phylogeny and evolutionary relationships among mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the northeastern United States based on small subunit ribosomal DNA (18S rDNA) sequences. *J Med Entomol.* 43: 443-454.
85. Singh OP, Chandra D, Nanda N, Raghavendra K, Sunil S, Sharma SK, Dua VK, Subbarao S K. 2004. Differentiation of members of the *Anopheles fluviatilis* species complex by an allele-specific polymerase chain reaction based on 28S ribosomal DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 70: 27-32.
86. Sirivanakarn S, White GB. 1978. Neotype designation of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Proc Entomol Soc Wash.* 30: 360-372.
87. Smith JL, Fonseca DM. 2004. Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg.* 70: 339-345.
88. Smith JL, Keyghobadi N, Matrone MA, Escher R, Fonseca DM. 2005. Cross-species comparison of microsatellite loci in the *Culex pipiens* complex and beyond. *Mol Ecol Notes.* 5: 697-700.
89. Sorensen JT, Campbell BC, Gill RJ, Steffen-Campbell JD. 1995. Non-monophyly of Auchenorrhyncha ("Homoptera"), based upon 18S rDNA phylogeny: eco-evolutionary and cladistic implications within pre-Heteropterodea Hemiptera (sl) and a proposal for new monophyletic suborders. *Pan-Pac Entomol.* 71: 31-60.
90. Sucharit S, Komalamisra N. 1997. Differentiation of *Anopheles minimus* species complex by RAPD-PCR technique. *J Med Assoc.* 80: 598-602.
91. Torres EP, Foley DH, Saul A. 2000. Ribosomal DNA sequence markers differentiate two species of the *Anopheles maculatus* (Diptera: Culicidae) complex in the Philippines. *J Med Entomol.* 37: 933-937.
92. Vinogradova EB. 2000. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Bulgaria: Pensoft Press.
93. Wang G, Li C, Guo X, Xing D, Dong Y, Wang Z, Zhang Y, Liu M, Zheng Z, Zhang H, Zhu X, Wu, Z, Zhao T. 2012. Identifying the main mosquito species in China based on DNA barcoding. *Plos One.* 7: e47051.
94. Wang XC, Liu C, Huang L, Bengtsson-Palme J, Chen H, Zhang JH, Cai D, Li JQ. 2015. ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? *Mol Ecol Resour.* 15: 573-586.
95. Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc B.* 360: 1847-1857.
96. Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M, 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 269: 2007-2016.
97. Wesson DM, Porter CH, Collins FH. 1992. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol Phylogenet Evol.* 1: 253-269.
98. Whiting M, Carpenter JC, Wheeler QD, Wheeler WC. 1997. The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst Biol.* 46: 1-68.
99. Wiegmann BM. 1994. The earliest radiation of the Lepidoptera: evidence from 18S rDNA. PhD thesis. University Maryland. EE. UU.
100. Wilkerson RC, Parsons TJ, Albright DG, Klein TA, Braun MJ. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: *Anopheles*). *Insect Mol Biol.* 1: 205-211.
101. Wilkerson RC, Reinert JF, Li C. 2004. Ribosomal DNA ITS2 sequences differentiate six species in the *Anopheles crucians* complex (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 41: 392-401.
102. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
103. Zane L, Bargelloni L, Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol.* 11: 1-16.
104. Zavortink TJ. 1974. The status of taxonomy of mosquitoes by the use of morphological characters. *Mosquito Systematics.* 6: 130-133.